



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

INFECÇÃO HUMANA POR VÍRUS DO DENGUE NO SÉCULO XXI: CAUSAS E CONSEQUÊNCIAS

Trabalho submetido por
Joana Isabel Martins Lourenço
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Outubro de 2013



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

INFEÇÃO HUMANA POR VÍRUS DO DENGUE NO SÉCULO XXI: CAUSAS E CONSEQUÊNCIAS

Trabalho submetido por
Joana Isabel Martins Lourenço
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Professora Doutora Perpétua Gomes

Outubro de 2013

*"Be curious always.
For knowledge will not acquire you,
You must acquire it."
Sudie Back*

Agradecimentos

Este trabalho encerra um longo e importante capítulo da minha formação académica e profissional. Gostaria de exprimir algumas palavras de agradecimento e reconhecimento a todos aqueles que contribuíram para a sua realização. Sem o seu incentivo e apoio, tal não seria possível.

Desta forma, quero prestar os meus sinceros agradecimentos à Professora Doutora Perpétua Gomes pela orientação científica desta tese. Agradeço também os seus conselhos, conhecimentos partilhados, valiosas contribuições, e em particular, a disponibilidade para ajudar demonstrada em todo o processo. Foi um privilégio contar com a sua ajuda!

Agradeço também à Doutora Maria Ana Pessanha, do Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental, pela disponibilidade demonstrada e grande ajuda prestada, partilhando informações essenciais no âmbito dos métodos rápidos de diagnóstico.

Ao meu namorado, Frederico, pelo carinho, compreensão, encorajamento e, principalmente, paciência inquestionável ao longo de todos estes anos. “Obrigada por dares cor aos meus dias mais cinzentos”.

A todos os meus grandes amigos agradeço pela cumplicidade, motivação, ajuda, companheirismo, mas acima de tudo pela amizade transmitida, tanto nos bons quanto nos maus momentos.

Ao meu padrinho, José Luís, pelos seus conselhos, ensinamentos, estímulo e, como farmacêutico, me aliciou na escolha desta carreira.

Por último, um agradecimento muito especial à minha família, sobretudo aos meus pais, Francisco e Conceição, e ao meu irmão, João, pela preocupação, incentivo e dedicação incansável em todos os momentos. Sempre me apoiaram nas minhas escolhas, conquistas e derrotas, por isso foram absolutamente essenciais em todas as fases do meu percurso académico.

A todos, o meu muito e sincero obrigada!

Joana Isabel Martins Lourenço

Outubro de 2013

Resumo

A infecção por vírus do dengue é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade nos países tropicais e subtropicais, contribuindo para inúmeras hospitalizações, sobretudo em crianças e pacientes imunologicamente comprometidos. Expandido um pouco por todo o mundo, o DENV é majoritariamente endêmico nos países da Ásia e da América Latina.

No ano precedente ocorreu um surto epidêmico na Região Autónoma da Madeira que culminou na reemergência do vírus na Europa, após 84 anos de ausência. Foram tomadas algumas providências de modo a minimizar o impacto da infecção, contudo, devido à subsistência do vetor *Aedes aegypti* na região, a ameaça de possíveis reinfeções permanece constante.

A prevalência desta arbovirose faz com que seja uma grande preocupação a nível da Saúde Pública Mundial, culminando em custos económicos e sociais consideráveis. As condições climáticas como temperatura e precipitação, a expansão da urbanização e o aumento do número de viajantes para locais epidémicos, são parâmetros que contribuem para a sua rápida proliferação e distribuição generalizada.

Como a infecção possui um amplo espectro de manifestações clínicas, com evolução e resultados frequentemente imprevisíveis, torna-se fundamental a constituição de um diagnóstico precoce, que permita uma atuação mais rápida, minimizando as consequências da doença.

Atualmente, ainda não existe uma vacina nem agentes antivirais efetivos contra o DENV, todavia, estima-se que tal se possa alcançar num futuro próximo. O progresso científico atingido nos últimos anos, caracterizado por inúmeras descobertas e contributos significativos, visa a grande expectativa na criação de uma cura para esta calamidade.

Palavras-chave: Vírus do dengue; *Aedes aegypti*; diagnóstico; terapêutica antiviral.

Abstract

Dengue is a major cause of morbidity and mortality in tropical and subtropical countries leading to numerous hospital interventions, especially among children and immunocompromised patients. Expanded all over the world, DENV is endemic mainly in Asia and Latin America.

In the previous year there was an epidemic outbreak in the Autonomous Region of Madeira which led to the re-emergence of dengue virus in Europe, after 84 years of absence. There were taken some measures to minimize the impact of the infection, however, due to the spread of the vector *Aedes aegypti* in the region, the threat of possible reinfections persists.

The prevalence of this arboviral disease remains a major concern in terms of Worldwide Public Health resulting in substantial economic and social costs. The wide spread and rapid distribution of dengue virus reflects the contribution of climatic conditions such as temperature and precipitation, the extension of urbanization and the rising number of travelers to epidemic countries.

As the infection has a wide range of clinical manifestations, usually with unpredictable development and results, the establishment of an early diagnosis is essential, which allows a fast use of countermeasures, minimizing the consequences of the disease.

Currently, there is neither vaccine nor effective antiviral agents against DENV, although it is estimated that this can be achieved in the near future. The scientific progress reached in recent years, characterized by many significant discoveries and contributions, aimed at creating great expectation of a cure for this calamity.

Keywords: Dengue virus; *Aedes aegypti*; diagnosis; anti viral therapy.

Índice geral

Capítulo 1 – Introdução geral.....	19
1.1 Evolução histórica do dengue	20
Capítulo 2 - Distribuição geográfica do dengue.....	23
2.1 América	24
2.1.1 América Latina	24
2.1.2 Região Andina.....	25
2.1.3 América Central	25
2.1.4 Região das Caraíbas	25
2.1.5 América do Norte	26
2.2 Ásia e Oceania.....	27
2.2.1 Sudeste Asiático	27
2.2.2 Pacífico Ocidental	28
2.2.3 Ilhas do Pacífico	28
2.3 África.....	28
2.4 Médio Oriente	29
2.5 Europa	29
2.5.1 Portugal - Dengue na Região Autónoma da Madeira.....	30
Capítulo 3 - Características do vetor	33
3.1 <i>Aedes aegypti</i>	33
3.1.1 <i>Aedes aegypti</i> em Portugal	38
3.2 <i>Aedes albopictus</i>	38
Capítulo 4 - Características gerais do vírus do dengue	41
4.1 Origem do vírus do dengue	42
4.2 Serótipos.....	45
4.2.1 DENV-1	45
4.2.2 DENV-2	46
4.2.3 DENV-3	46
4.2.4 DENV-4	46
4.3 Glicoproteínas virais	47
4.3.1 Importância da glicoproteína E na patogénese viral.....	51
4.4 Síntese do RNA viral.....	52
4.5 Entrada do vírus na célula hospedeira	54
Capítulo 5- Classificação da infeção por DENV.....	55
Capítulo 6 - Fisiopatologia da infeção por DENV	57

6.1 Resposta imunitária	59
6.1.1 Fenómeno de imunoamplificação dependente de anticorpos, ADE	61
6.1.2 Importância das citocinas na imunopatogénese	62
6.1.3 Papel do Interferão na resposta imunitária	62
6.2 Resposta alérgica	63
6.3 Suscetibilidade ou resistência ao vírus do dengue	64
Capítulo 7 – Diagnóstico	65
7.1. Diagnóstico diferencial	65
7.2. Diagnóstico laboratorial	65
7.2.1. Isolamento do vírus	67
7.2.2. Ensaaios serológicos	68
7.2.2.1 Ensaio MAC-ELISA	69
7.2.2.2 Ensaio IgG-ELISA	70
7.2.2.3 Ensaaios de neutralização	71
7.2.3 Métodos de amplificação dos ácidos nucleicos	71
7.2.3.1 Ensaio PCR utilizando transcriptase reversa, RT-PCR	71
7.2.3.2 Ensaio PCR em tempo real, RT-PCR	72
7.2.4 Ensaaios utilizando a deteção de antígenos	72
7.2.4.1 Deteção de antígenos (glicoproteína NS1)	73
7.2.4.2 Imunohistoquímica	73
7.2.5 Testes rápidos de deteção de antígenos e anticorpos	73
7.2.5.1 Testes rápidos de deteção de antígenos da glicoproteína NS1	74
7.2.5.2 Testes rápidos de deteção de Anticorpos (IgM e IgG)	75
Capítulo 8 - Medidas de prevenção e controlo	77
8.1 Métodos químicos	78
8.2 Métodos biológicos	78
8.3 Tratamento	80
8.3.1 Potencial uso terapêutico do balapiravir	81
8.3.2 Novas estratégias terapêuticas de uso antiviral	82
8.4 Vacinas	84
8.4.1 Vacinas vivas atenuadas	85
Capítulo 9 – Conclusão	87
Bibliografia	89

Índice de figuras

Figura 1. Extensão geográfica dos países e áreas em risco de desenvolver dengue	23
Figura 2. Fêmea adulta de <i>Aedes aegypti</i> no momento da picada.....	34
Figura 3. Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i> representando as quatro fases, fase de ovo, fase larval, fase pupal e fase adulta.....	35
Figura 4. <i>Aedes albopictus</i> , vetor do vírus do dengue e de outros arbovírus	40
Figura 5. Ciclo zoonótico (selvagem) e ciclo endêmico (epidêmico) do vírus do dengue	43
Figura 6. Organização do genoma de RNA viral, constituído pelas proteínas estruturais e não estruturais e suas funções na replicação do RNA	47
Figura 7. Conformação trimérica da proteína E após entrada do vírus na célula hospedeira.....	49
Figura 8. Modelo da síntese de RNA do vírus do dengue.....	53
Figura 9. Patogénese da infeção pelo vírus do dengue.....	63
Figura 10. Comparação entre os métodos de diagnóstico de uma infeção por dengue de acordo com a sua acessibilidade e especificidade	66
Figura 11. Via de entrada do vírus na célula hospedeira, com representação dos recetores celulares envolvidos	83

Índice de tabelas

Tabela 1. Dados epidemiológicos relativos às várias regiões do globo onde se registaram casos de dengue, no período decorrido entre 2001 e 2007	30
Tabela 2. Episódios de dengue registados na Região Autónoma da Madeira entre 3 de Outubro e 25 de Novembro de 2012	31
Tabela 3. Fases da infeção pelo vírus do dengue e suas consequências para o hospedeiro.....	57
Tabela 4. Doenças e microorganismos a ter em conta na realização de um diagnóstico diferencial de uma infeção pelo vírus do dengue	65
Tabela 5. Critérios laboratoriais para infeções confirmadas e infeções prováveis.....	67
Tabela 6. Vantagens e desvantagens dos vários métodos de diagnóstico de uma infeção por DENV	76

Lista de abreviaturas

Å - Unidades Angstrom.

a.C. - Antes de Cristo.

ADE - Anticorpos Potencializadores de Infecção.

Ae. aegypti - *Aedes aegypti*.

Ae. albopictus - *Aedes albopictus*.

AP61 – Células de *Aedes pseudocustellaris*.

BHK21 – Células Procedentes do Rim de Hamsters.

C – Proteína da Cápside.

C3e C5 – Proteínas do Sistema de Complemento.

C6/36 – Linhagem Celular Proveniente de *Aedes albopictus*.

CLEC5A – *C-type Lectin Like Molecule*.

C-terminal – Extremidade Carboxílica da Cadeia Polipeptídica.

DC-SING - *C-type Lectin ICAM3-Grabbing Non-Integrin*.

DENV - Vírus do Dengue.

DENV - 1-4 - Serótipos do vírus do Dengue do 1 ao 4.

DNA – Ácido Desoxirribonucleico.

E - Proteína do Invólucro.

Fc - Recetor para a Porção Constante dos Anticorpos.

FD - Febre do Dengue.

FHD - Febre Hemorrágica do Dengue.

GAG – Glicosaminoglicanos.

HCV – Vírus da Hepatite C.

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana.

HLA - Antígeno Leucocitário Humano (*Human Leukocyte Antigen*).

ICAM-3 - *Intercellular Adhesion Molecule-3 Grabbing Non-Integrin*.

IFN - Interferão.

IFN α – Interferão Alfa.

IFN β - Interferão Beta.

IFN γ - Interferão Gama.

IgE- Imunoglobulina E.

IgG - Imunoglobulina G.

IgM - Imunoglobulina M.
 IL-6 – Interleucina 6.
 IL-8 – Interleucina 8.
 IL-10 – Interleucina 10.
 LLC-MK 2 – Linhagem Celular Proveniente do Rim de Macacos *Rhesus*.
 M – Proteína da Membrana.
 MAC-ELISA – Ensaio Imunoenzimático de Detecção de Anticorpos M.
 mm – Milímetros.
 mRNA – RNA Mensageiro.
 NK – Células *Natural Killers*.
 nm – Nanómetros.
 NS – Proteína Estrutural.
 N-terminal – Extremidade amina da cadeia polipeptídica.
 NTPase – Helicase de nucleótido trifosfato.
 OMS – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*).
 ORF – *Open Reading Frame*.
 PCR – Reação de Polimerização em Cadeia (*Polimerase Chain Reaction*).
 pb – Pares de Bases.
 prM – Proteína Precursora da Proteína da Membrana.
 PRNT – Técnica de Neutralização por Redução em Placas (*Plaque Reduction Neutralization Technique*).
 R4179 – Análogo Nucleósido 4'-Azidocitina.
 RdRp – Enzima RNA Polimerase Dependente de RNA.
 RER – Retículo endoplasmático rugoso.
 RIDL – *Release of Insects Carrying a Dominant Lethal*.
 RNA – Ácido Ribonucleico.
 RT-PCR - Reação de Polimerização em Cadeia em Tempo Real.
 SCD – Síndrome do Choque do Dengue.
 SLA – *Stem-loop structure A*.
 SLB – *Stem-loop structure B*.
 STAT 2 – Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição.
 TNF- α – Fator Tumoral de Necrose Alfa.
 YV-VAX – Vacina contra a Febre Amarela.

Objetivos e métodos

A presente monografia compreende uma revisão bibliográfica atual referente ao vírus do dengue. Este trabalho pretende alertar sobre a emergência e prevalência do dengue e suas consequências a nível mundial. Deste modo, possibilita um melhor conhecimento acerca do tema, sendo descrita de forma sucinta, a evolução histórica, a distribuição geográfica, com destaque para a situação portuguesa, particularmente, o surto ocorrido na Madeira, a caracterização dos vetores da família *Aedes spp.*, a caracterização e patogénese viral, a classificação e fisiopatologia da infeção, os métodos de diagnóstico, as medidas de controlo, prevenção e tratamento, e as perspetivas futuras, evidenciando a evolução no desenvolvimento de vacinas e agentes antivirais.

A escolha do tema deveu-se ao meu interesse na área da Virologia, nomeadamente no ramo da Medicina Tropical, levando-me a querer saber mais acerca desta temática. O seu impacto global e enquadramento na atualidade científica, os casos decorridos no ano precedente na Região Autónoma da Madeira, e os surtos epidémicos frequentes um pouco por todo o mundo, aliados ao desejo de querer adquirir um conhecimento mais aprofundado nesta área, foram igualmente razões preponderantes na seleção.

Iniciou-se a elaboração desta monografia com a pesquisa, levantamento, recolha e seleção de informação contida em artigos científicos e livros sobre o tema proposto, no período decorrido entre Março e Outubro de 2013. No decorrer deste trabalho, são evidenciadas as características da infeção pelo vírus do dengue, suas causas e consequências para a saúde pública mundial atual.

Como metodologia utilizou-se a consulta manual de livros da especialidade de Virologia de forma a obter conceitos gerais e de índole introdutória sobre o vírus do dengue, particularmente, a classificação filogenética, o genoma viral, o ciclo de replicação viral e a patogénese. De seguida, procedeu-se à pesquisa de artigos científicos em bases de dados eletrónicas como *PubMed*, *SciELO*, *Medline*, *World Health Organization*, *Centers for Disease Control and Prevention*, *ScienceDirect* e em revistas científicas como a *Science*, *Nature*, *Viruses*, *PLoS ONE*. A procura foi iniciada com uma abordagem generalizada, utilizando-se palavras chave tais como, “dengue virus”, “dengue fever”, “*Aedes aegypti*”, “*Aedes albopictus*”. Posteriormente, e à medida que o trabalho se desenvolvia, foram empregues nos motores de busca, palavras

de carácter mais específico, nomeadamente “*dengue vaccine*”, “*dengue transmission*”, “*dengue diagnosis*”, “*dengue RNA genome*”.

A atualidade dos artigos científicos foi valorizada ao longo de toda a pesquisa, dando-se preferência aos mais recentes e relevantes. Os artigos consultados inserem-se no período compreendido entre 1990 e 2013.

Para a realização da bibliografia foi usado o programa de organização e gestão de citações e referências bibliográficas, *Mendeley Desktop*[®], versão 1.10.1.

Capítulo 1 – Introdução geral

O dengue é a doença de origem viral, transmitida por artrópodes, mais importante no Homem. Nos últimos anos tem-se verificado um preocupante aumento da incidência e da propagação do vírus, com manifesta disseminação para áreas outrora não afetadas (Iglesias & Gamarnik, 2011).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), “nos últimos 50 anos a incidência de casos de dengue tem aumentado cerca de 30 vezes, devendo-se tal facto ao aumento da expansão geográfica para novos países, e, na década atual, à migração das áreas urbanas para as áreas rurais.” (World Health Organization, 2009). De acordo com um estudo desenvolvido recentemente, estima-se que em cada ano, cerca de 390 milhões de pessoas sejam infetadas pelo vírus do dengue, em que destas, 96 milhões apresenta manifestações clínicas da infeção (Bhatt *et al.*, 2013).

O dengue é maioritariamente prevalente em regiões tropicais e subtropicais, onde as condições ecológicas e epidemiológicas favorecem o vírus. Estas regiões apresentam ambientes propícios à disseminação, abrigando os principais vetores do dengue, o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus*. A extensa infestação de mosquitos, o aumento do número de hospedeiros suscetíveis e a constante inserção e circulação de um ou mais serótipos do DENV, são razões que contribuem para a endemicidade das infeções numa dada região (Guzman & Istúriz, 2010).

Este dramático aumento no número de países afetados pelo vírus reflete a expansão dos mosquitos vetores *Aedes spp.*, bem como o acréscimo de hospedeiros humanos suscetíveis. Contudo, exprime também o planeamento de território e urbanização precários existentes em algumas cidades de países em desenvolvimento. Nestes últimos, o crescimento populacional, aliado à urbanização excessiva e deficiente, conduz a um descontrolo na gestão do saneamento e resíduos urbanos, resultando em acumulação de materiais não degradáveis, que se convertem em autênticos reservatórios para as larvas dos mosquitos (Gibbons & Vaughn, 2002).

Por outro lado, em países onde a doença não é endémica, a maior parte das infeções é limitada a viajantes provenientes dos trópicos, todavia, a possibilidade de ocorrerem surtos é constante. Assim, torna-se pertinente controlar a incidência, distribuição e impacto clínico do vírus a nível mundial (Gibbons & Vaughn, 2002).

Nos últimos anos, em consequência do fracasso nos esforços para reduzir a transmissão e propagação do vetor, e sem nenhum tratamento antiviral eficaz

disponível, esta situação tem vindo a complicar-se, podendo continuar a agravar-se no futuro. Assim, é extremamente necessário o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz contra os quatro serótipos do vírus (Guzman & Istúriz, 2010).

1.1 Evolução histórica do dengue

Os primeiros registos epidémicos de uma doença com manifestações semelhantes ao dengue são originários da China. Uma enciclopédia de “sintomas de doenças e remédios”, que foi publicada na Dinastia Chin, de 245 até 420 a.C., sendo mais tarde editada na Dinastia Tang, em 620 a.C., e posteriormente na Dinastia Sung, em 992 a.C., referia-se ao dengue como “veneno da água”. Esta denominação deriva do facto de os chineses acreditarem que os insetos eram os causadores da doença, relacionando-os de certa forma com a água. Os sintomas descritos incluíam febre, erupções cutâneas, artralgia, mialgia e hemorragias (Gubler, 1998).

De acordo com outros registos históricos, ocorreram surtos com características clínicas semelhantes ao dengue nas Antilhas Francesas e Caraíbas, em 1635, e no Panamá e América Central, em 1699 (Gubler, 1998).

Subsequentemente, foram registadas epidemias similares nos anos 1779 e 1780, em três continentes, Ásia, África e América do Norte. Em 1779, os surtos foram registados em Jacarta, na Indonésia, e na cidade do Cairo, Egito, enquanto que no ano de 1780 as epidemias ocorreram na cidade de Filadélfia, nos Estados Unidos (Henchal & Putnak, 1990). Estes registos vêm reforçar a suspeita de uma distribuição generalizada dos vetores (Guzman & Istúriz, 2010).

O primeiro caso confirmado de dengue foi descrito por Benjamin Rush em 1789, que o apelidou de “febre quebra-ossos” dado o carácter agressivo da doença, caracterizada por artralgias e mialgias frequentes (Guzman & Istúriz, 2010; Halstead, 2008). Rush observou os pacientes do surto decorrido em Filadélfia, descrevendo as suas manifestações clínicas. Estes pacientes registaram dores de cabeça, dores oculares, náuseas, vômitos, erupções cutâneas, mialgias, ou seja, sintomas característicos da infeção pelo vírus do dengue (Halstead, 2008).

Os séculos XVIII e XIX foram marcados por grandes epidemias. O dengue começou a difundir-se um pouco por toda a região tropical graças à forte expansão no comércio e indústria naval. Tanto o vírus, quanto o vetor *Ae. aegypti*, eram distribuídos por via marítima, através de navios que faziam as trocas comerciais. O vetor iniciava o seu ciclo replicativo nas águas estagnadas que se encontravam armazenadas nos barcos

e, assim que chegavam ao destino, o mosquito e o vírus propagavam-se nessa nova região (Gubler, 2002).

Entre o período de 1823 a 1905, foram relatados vários episódios espalhados um pouco por todo o Mundo, com destaque para os surtos pandémicos ocorridos em Zanzibar, Calcutá, Antilhas Ocidentais e Hong Kong (Henchal & Putnak, 1990). Acredita-se que estes surtos provinham do mesmo serótipo, e que este era distribuído geograficamente através das trocas comerciais e comércio de escravos (Weaver & Vasilakis, 2009). A origem do nome da doença remonta a este período. Em África e na Índia Ocidental, foi designada pelo termo “*denga*” ou “*dyenga*”. Contudo, após um surto epidémico em Cuba, ocorrido em 1828, a infeção passou a ser denominada na literatura clínica, pela palavra espanhola “*dengue*”, cuja tradução (*staggering weakness*), sugere para as tonturas e vertigens registadas na infeção (Halstead, 2008).

Apesar de existirem vários registos de epidemias no século XX, alguns dos maiores surtos epidémicos foram registados nos Estados Unidos da América (EUA) em 1922, com cerca de 2 milhões de pessoas com sintomas de febre do dengue (Henchal & Putnak, 1990).

Na Europa, a última epidemia de grande proporção ocorreu em 1927 e 1928, na Grécia. Este surto epidémico resultou do elevado número de refugiados na região, que culminou num acréscimo de reservatórios de água. Como estes locais constituem focos reprodutivos do vetor *Aedes aegypti*, consequentemente, o mosquito tornou-se endémico, transmitindo o vírus (Halstead, 2008).

Como consequência da Segunda Guerra Mundial, ocorreram alterações epidemiológicas, demográficas e ecológicas importantes, que determinaram o aumento da incidência e da transmissão do vírus, particularmente no Sudeste Asiático e região do Pacífico. Os militares nesta região eram infetados pelo DENV frequentemente. Deste modo, os movimentos dos combatentes instigaram a progressão e transmissão do vírus entre as metrópoles desta área (Gubler, 2002; Halstead, 2008).

Com a circulação concomitante dos vários serótipos do DENV, o Sudeste da Ásia e região do Pacífico, tornou-se endémico. Por conseguinte, aumentaram o número de indivíduos suscetíveis, emergindo a febre hemorrágica do dengue. A primeira epidemia de FHD registou-se em Manila, nas Filipinas, de 1953 a 1954. Nos vinte anos subsequentes, este flagelo tornou-se na principal causa de hospitalização e morte em crianças na região (Gubler, 1998).

Entre os anos 50 e 70, os EUA realizaram uma campanha de sensibilização com o intuito de erradicar o mosquito *Aedes aegypti* e, deste modo, combater a febre amarela e o dengue. O vetor chegou a estar circunscrito de 1946 a 1963. Contudo, o sucesso foi provisório, dado que o programa de controlo foi dissolvido, tendo, consequentemente originado a proliferação do mosquito na maior parte dos países da região (Gubler, 2002; Guzman & Istúriz, 2010).

Nas décadas de 80 e 90, a transmissão intensificou-se nas ilhas do Pacífico e em todo o continente americano, o que conduziu à emergência da febre hemorrágica do dengue e ao aumento da incidência da febre do dengue. Tal facto resultou da expansão geográfica do vírus e de ambos os vetores, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Gubler, 1998). A partir dessa altura, o vírus do dengue tornou-se endémico nos trópicos, sendo responsável por muitos surtos (Henchal & Putnak, 1990).

A evolução demográfica, o crescimento urbanístico, a expansão económica e a progressão na rede de transportes, são exemplos de fatores que contribuíram para a distribuição e reprodução do vetor, com consequente aumento da incidência e propagação generalizada do vírus (Gubler, 2002; Guzman & Istúriz, 2010).

Capítulo 2 - Distribuição geográfica do dengue

No início do século XXI, o dengue tornou-se na doença transmitida por artrópodes mais importante no Homem, sendo a virose de mais rápida disseminação um pouco por todo o Mundo (Guzman & Istúriz, 2010). Apesar da transmissão do DENV ser mais frequente nos trópicos, os continentes asiático e americano constituem as áreas de maior risco de desenvolvimento de epidemias (Bhatt *et al.*, 2013).

De acordo com a OMS, existem mais de 100 países tropicais e subtropicais que são endêmicos para o vírus e, destes, cerca de 60 têm vindo a registar anualmente, casos de febre hemorrágica do dengue. Acredita-se também que cerca de 40% da população mundial, ou seja, aproximadamente 2,5 biliões de pessoas, resida em zonas onde o risco de transmissão da doença é eminente. Na região do Pacífico, na Ásia, na América, no Médio Oriente e África, o número de casos de dengue está constantemente a aumentar (World Health Organization, 2009). Na figura 1, está representado um mapa que delimita as áreas de maior risco de transmissão do vírus do dengue.



Figura 1. Extensão geográfica dos países e áreas em risco de desenvolver dengue. As linhas de contorno vermelho demarcam as áreas de risco, onde o vetor existe, definidas pelos limites geográficos do hemisfério norte e sul. Adaptado de: (World Health Organization, 2009).

Para além de serem endêmicos, existem países que são hiperendêmicos, ou seja, em que todos os serótipos do vírus circulam concomitantemente. Este fenómeno favorece o risco de desenvolvimento de reinfeções, com particular aumento da gravidade dos episódios de dengue (Añez & Rios, 2013).

Quando são estabelecidas condições favoráveis, o vírus atua de forma epidémica. A ocorrência de surtos resulta, então, de fatores tais como a subsistência do vetor, as condições climáticas propícias e a existência de hospedeiros suscetíveis (Añez & Rios, 2013; Guzman & Istúriz, 2010).

2.1 América

Nas últimas três décadas tem-se registado um relevante acréscimo da propagação do vírus no continente americano, apesar de a sua transmissão seguir um padrão sazonal. De acordo com dados da *Pan American Health Organization*, os episódios de dengue aumentaram exponencialmente de 1.033.417 (16.4/100.000) durante os anos 80, para 2.725.405 (35.9/100.000) nos anos 90 e 4.759.007 (71.5/100.000) durante a década seguinte (Guzman & Istúriz, 2010).

A propagação do vírus segue um padrão cíclico, sendo verificados surtos a cada 3-5 anos. O maior surto descrito no continente americano ocorreu em 2002, onde foram notificados mais de um milhão de episódios. De acordo com os dados da OMS, entre 2001 e 2007 foram registados um total de 4.332.731 casos de febre do dengue, 106.037 episódios de febre hemorrágica do dengue, resultando no falecimento de 1.299 indivíduos (Guzman & Istúriz, 2010; World Health Organization, 2009).

Todos os quatro serótipos do vírus foram identificados no continente. Em alguns países, os serótipos circulam mesmo em simultâneo, nomeadamente, na Colômbia, El Salvador, Guatemala, Guiana Francesa, México, Peru, Porto Rico, República Dominicana, Venezuela e Barbados (World Health Organization, 2009).

Estes dados, porém, são sensíveis a várias circunstâncias e podem sofrer alterações. A circulação de cada serótipo num dado país é variável, havendo modificações na disposição dos subtipos de DENV. Numa região, o mesmo serótipo pode ser introduzido várias vezes ou ser distribuído para outras áreas diferentes. A diferença entre os surtos sugere a diversidade na distribuição geográfica dos quatro serótipos. (Guzman & Istúriz, 2010).

2.1.1 América Latina

No período decorrido entre 2001 e 2007 ocorreram 2.798.601 casos de febre do dengue na região da América Latina, em países como Brasil, Argentina, Chile, Uruguai e Paraguai. Destes episódios, 6.733 foram representativos de febre hemorrágica do dengue e resultaram num total de 500 óbitos (World Health Organization, 2009).

O Brasil é o país do continente americano com mais registros de casos de dengue, apresentando uma percentagem de 54,5 (Guzman & Istúriz, 2010).

Na mais recente epidemia registada no Brasil, em 2010 e 2011, os dados epidemiológicos registados pelo Ministério da Saúde Brasileiro apontam para um total de 1.666.208 casos de dengue no país. Estes episódios, provocados pelo DENV-4, resultaram em 26.659 casos de febre hemorrágica do dengue e 1.097 mortes. Em 2010, o serótipo 4 reemergiu no Brasil, passados 28 anos. Para além da reemergência do DENV-4, foi introduzido um novo genótipo na região. A presença de um genótipo cuja população não se encontra imunizada, contribui para o risco de desenvolvimento dos síndromes mais graves da doença (Roberto *et al.*, 2012).

2.1.2 Região Andina

Compreendida pela Bolívia, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela, esta área registou 819.466 dos casos de dengue, no período decorrido entre 2001 e 2007.

A zona Andina é caracterizada pela prevalência de febre hemorrágica do dengue, tendo sido a região que apresentou o maior número de episódios, ou seja, 61.341 casos, resultando em 306 óbitos. A Venezuela é o país onde a FHD é mais prevalente, com 35% dos casos. Neste país, este síndrome manifesta-se maioritariamente em crianças. Por outro lado, a Colômbia foi o país que registou a taxa de letalidade mais elevada. Foram notificados 225 óbitos, representativos de 74% do número total (Guzman & Istúriz, 2010; World Health Organization, 2009).

2.1.3 América Central

Entre 2001 e 2007, a OMS reportou um total de 545.049 episódios de dengue, sendo que destes, 35.746 são relativos a febre hemorrágica do dengue, com um registo de 209 mortes. Nesta região, a Costa Rica, as Honduras e o México constituem os países onde o dengue é mais prevalente. No que diz respeito à mortalidade, a República do Nicarágua apresenta o valor mais elevado, com um total de 64 óbitos (31%). Na América Central, os serótipos de DENV mais comuns são o DENV-1, DENV-2 e DENV-3 (World Health Organization, 2009).

2.1.4 Região das Caraíbas

Na área das Caraíbas encontram-se distribuídos todos os serótipos do vírus do dengue, apesar de o DENV-1 e o DENV-2 serem os mais prevalentes. Os países que

registaram o maior número de episódios provocados pelo vírus do dengue foram, Cuba, Porto Rico, República Dominicana, Martinica, Trinidad e Tobago e Guiana Francesa. Na Região da Caraíbas foram notificados 168.819 casos, em que destes, 2.217 foram de FHD, resultando em 284 mortes. Nesta região, a República Dominicana foi o país que notificou o maior número de mortes. Foram registados 220 óbitos o que corresponde a uma percentagem de 77% (World Health Organization, 2009).

2.1.5 América do Norte

Nos países da América do Norte, os casos são descritos maioritariamente em viajantes e imigrantes, provenientes de países onde o dengue é endémico (Adalja, Sell, Bouri, & Franco, 2012; Guzman & Istúriz, 2010; World Health Organization, 2009).

O DENV constitui o principal responsável pelos episódios de febre registados em viajantes, sobretudo dos que provêm da América Central, América do Sul e Caraíbas, ou seja, regiões caracterizadas pela forte afluência de turistas norte-americanos. Verifica-se então que a maioria dos casos são importados, no entanto, têm havido alguns episódios autóctones (Añez & Rios, 2013).

Foram notificados episódios de dengue em praticamente todos os estados americanos, com excepção do Alasca. Apesar da existência de surtos ocasionais no território norte-americano, a transmissão secundária é rara (Guzman & Istúriz, 2010).

Os surtos epidémicos mais recentes foram registados no Hawaii em 2001, no Texas em 2005 e na Flórida em 2009 (Adalja *et al.*, 2012; Añez & Rios, 2013).

Os principais vetores do vírus, o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus* encontram-se distribuídos um pouco por todo o território, maioritariamente no sul e sudeste. A forte atividade de viagens, sobretudo por via aérea, contribui para a célere distribuição dos artrópodes e consequente disseminação do vírus (Añez & Rios, 2013). Assim, deduz-se que o acréscimo de viajantes e as populações de vetores residentes são fatores que fazem com que a possibilidade de epidemias seja eminente (Adalja *et al.*, 2012).

Algumas metrópoles dos EUA, particularmente, Nova Iorque, Atlanta, Miami, Washington, Los Angeles e São Francisco, constituem zonas de influente tráfego aéreo e possuem extensos aeroportos. Deste modo, podem receber vários passageiros potencialmente afetados por doenças infecciosas provocadas por vírus, tais como o dengue, encefalite japonesa ou Chikungunya. Estas regiões populosas, possuem potencial para se tornarem autênticas vias de entrada para arbovírus. Assim, a

constituição de estratégias que visem dominar e erradicar os vetores é imperativa (Añez & Rios, 2013).

2.2 Ásia e Oceania

Após a Segunda Guerra Mundial, o dengue tornou-se uma preocupação no continente asiático. A constante urbanização aliada à forte expansão populacional, contribuem para a endemicidade do vírus, sobretudo na área do Sudeste da Ásia e Pacífico Ocidental (Guzman & Istúriz, 2010).

A primeira grande epidemia registou-se nas Filipinas entre 1953 e 1954, e, desde essa altura que têm vindo a ser registados vários surtos um pouco por todo o continente. Os países asiáticos que registam o maior número de episódios são, Vietname, Malásia, Camboja, Tailândia e Filipinas. Para além destes, na Índia, Indonésia, Nepal, Sri Lanka, Timor-Leste, Bangladesh e Ilhas do Pacífico também foram registados surtos de dengue (Guzman & Istúriz, 2010; World Health Organization, 2009).

Como o vetor *Ae. aegypti* se encontra disseminado um pouco por todo o território, tanto em ciclos rurais como ciclos urbanos, a probabilidade de ocorrência destas epidemias é elevada. Nestas regiões, o dengue é a principal causa de hospitalização em crianças, o que constitui uma preocupação ao nível da Saúde Pública Asiática (World Health Organization, 2009).

A China, o país mais populoso do mundo, registou vários surtos de dengue sobretudo nos anos 80 e 90. No entanto, apesar de não serem descritos casos de dengue desde 2003, a preocupação neste país é constante, pois para além da elevada densidade populacional, é um país que possui algumas áreas tropicais (Guzman & Istúriz, 2010).

2.2.1 Sudeste Asiático

Esta área manifesta um carácter cíclico na ocorrência de epidemias, havendo transmissão hiperendémica, ou seja, todos os quatro serótipos do DENV subsistem a região. A hiperendemicidade na transmissão, verifica-se maioritariamente nos casos provenientes de infeções secundárias (Guzman & Istúriz, 2010). Os surtos epidémicos cíclicos manifestam-se sobretudo na Tailândia, Bangladesh, Índia e Maldivas, países onde predomina o clima tropical, caracterizado por temperatura e humidade elevadas (World Health Organization, 2009).

A taxa de letalidade no Sudeste Asiático é de cerca de 2%, contudo, na Índia, Indonésia e Birmânia este valor compreende-se entre 3-5%. Desde o ano 2000, tem-se

manifestado uma forte expansão do vírus na região, inclusive com a abrangência de novos países. De entre os surtos mais relevantes do ponto de vista da letalidade, encontram-se a pandemia ocorrida na Indonésia em 2007, onde foram notificados cerca de 150.000 casos de dengue, com uma percentagem de óbitos de cerca de 1%, e o surto decorrido em Timor Leste, com uma percentagem de letalidade de 3,55% (World Health Organization, 2009).

Na Índia são descritos surtos de dengue desde 1945. Com a presença dos quatro serótipos, a transmissão do vírus ocorre tanto em meios urbanos como em meios rurais. Nos últimos anos tem sido registado um aumento considerável da incidência em cidades muito populosas, nomeadamente em Deli (Guzman & Istúriz, 2010).

2.2.2 Pacífico Ocidental

Desde a grande pandemia ocorrida em 1998, esta região tem sido caracterizada por vários episódios recorrentes. No período decorrido entre 2001 e 2007 foram notificados 1.020.333 casos e 4798 mortes (cerca de 0,5%), resultantes da infeção por dengue, na área do Pacífico Ocidental. Países como o Camboja, Filipinas, Malásia e Vietname registaram o maior número de epidemias e óbitos, sendo que destes quatro países, o Camboja e as Filipinas foram os que mais contribuíram para tal registo (World Health Organization, 2009).

2.2.3 Ilhas do Pacífico

As ilhas do Pacífico mais afetadas por surtos de dengue foram, Polinésia Francesa, Nova Caledónia, Ilhas Cook, Samoa Americana, Palau e Micronésia. Os dados epidemiológicos recolhidos na região revelaram que ocorreram 50.028 casos, com um total de 34 mortes (World Health Organization, 2009).

2.3 África

Desde o século XX que o vírus do dengue reside em África, com predominância na região da África Subsariana. Os países com maior registo de surtos são o Quênia, Moçambique, Ilhas Seichelles, República do Djibouti, Somália, Costa do Marfim, Senegal e Burkina Faso (Guzman & Istúriz, 2010). Devido à circulação de todos os serótipos do DENV e das escassas medidas de controlo, o dengue tem registado uma subida galopante nas últimas décadas, com a prevalência do vírus principalmente na região oriental africana. Apesar de não ser considerado um fator de doença major no

continente africano, comparativamente a outras preocupações como o HIV ou a malária, o dengue tem vindo a revelar a sua patogenicidade e mortalidade ao longo dos tempos, com o aumento exponencial da ocorrência de surtos no território (World Health Organization, 2009).

2.4 Médio Oriente

Os serótipos 1, 2 e 3 predominam nesta região, tendo ocorrido várias epidemias, por eles provocadas, ao longo dos séculos. Os episódios mais recentes de dengue foram registados no Paquistão, Arábia Saudita, Sudão e Yémen em 2005/2006. Em 2005, no Paquistão, ocorreu um surto de febre hemorrágica do dengue, provocada pelo DENV-3. Desde essa altura que têm sido notificados vários casos, com relevante gravidade, constituindo uma preocupação na Saúde Pública do país. A Arábia Saudita notificou três grandes epidemias, uma em 1994, provocada pelo DENV-2, uma em 2006 provocada pelo DENV-1, e outra em 2008 causada pelo DENV-3. Em todas estas epidemias foram reportados casos de febre hemorrágica do dengue e de choque hemorrágico do dengue, com algumas mortes, sendo que a mais grave foi a ocorrida em 2006, com seis óbitos. O Yémen é outro país que tem revelado vários casos de dengue. Em 2005 houve uma grande epidemia provocada pelo DENV-3, e desde esse ano, o número de episódios tem vindo a aumentar exponencialmente (World Health Organization, 2009).

2.5 Europa

Os casos de febre do dengue registados neste continente provêm de indivíduos que viajam para regiões tropicais, particularmente para a América Latina, África, Sudeste Asiático e região das Caraíbas. O aumento do número de casos descritos é diretamente proporcional à expansão do turismo e das viagens para as zonas endémicas (Guzman & Istúriz, 2010).

Entre 2007 e 2012 ocorreram vários casos autóctones de dengue na região do mediterrâneo, nomeadamente, em Itália, França, Croácia e em Portugal, na Madeira. Através de testes de biologia molecular, confirmou-se que o agente etiológico, responsável pelos casos reportados, era o DENV-1. Durante estes surtos na Europa, foram implementadas várias estratégias de controlo dos principais vetores de dengue, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. A contenção dos artrópodes é fundamental para reduzir o impacto do vírus. Como a Europa inclui todas as características propícias à

transmissão do vírus, nomeadamente, residência dos vetores, viajantes para países tropicais e condições climáticas favoráveis, deste modo, a observação e vigilância constantes, são essenciais (Tomasello & Schlagenhauf, 2013).

Apesar de atualmente o vírus não ser endémico no continente europeu, já o foi no passado, em algumas sub regiões, particularmente, nos Balcãs e nos países mediterrâneos. Permanecendo o risco de ocorrência de epidemias futuras, mantém-se a preocupação em relação ao dengue (World Health Organization, 2009).

A tabela 1 indica de forma resumida os dados representativos da infeção por dengue nas várias regiões do mundo entre 2001 e 2007.

Tabela 1. Dados epidemiológicos relativos às várias regiões do globo onde se registaram casos de dengue, no período decorrido entre 2001 e 2007. (Adaptado de: World Health Organization, 2009).

Continente	Região	Número de casos	Número de óbitos	Percentagem de letalidade (%)
América	América Latina	2.798.601	500	0,02
	Região Andina	819.466	306	0,04
	América Central	545.049	209	0,04
	Região das Caraíbas	168.819	284	0,17
	América do Norte	N.D.	N.D.	N.D.
Ásia e Oceania	Sudeste asiático	N.D.	N.D.	~ 2
	Região do Pacífico Ocidental	1.020.333	4.798	0,47
	Ilhas do Pacífico	50.028	34	0,07
África	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Europa	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Legenda: N.D. - Não definido.

2.5.1 Portugal - Dengue na Região Autónoma da Madeira

Entre Outubro de 2012 e o início de 2013, ocorreu um surto epidémico de dengue na Região Autónoma da Madeira, onde foi registado um total de 2.144 casos (Alves *et al.*, 2013).

No período decorrido entre 3 de Outubro e 25 de Novembro de 2012, foram descritos 1.891 episódios, ocorridos maioritariamente em adultos com idades compreendidas entre os 25 e os 64 anos, como se encontra representado na tabela 2 (Sousa *et al.*, 2012).

Tabela 2. Episódios de dengue registados na Região Autónoma da Madeira entre 3 de Outubro e 25 de Novembro de 2012. A tabela representa o número de casos ocorridos, divididos por faixa etária e respetiva percentagem. (Adaptado de: Sousa *et al.*, 2012).

Faixa etária (idade)	Número de casos	Percentagem (%)
0-14	240	12,7
15-24	299	15,8
25-64	1.132	59,9
+65	220	11,6
Total	1.891	100

Desde 1928 que não ocorriam surtos de tamanha proporção na Europa, contudo, têm sido descritos alguns casos esporádicos de febre do dengue em indivíduos regressados de viagens de países endémicos. Em Portugal, todos os anos são registados episódios importados principalmente do Brasil, porém, também são identificados casos de indivíduos provenientes de Timor-Leste, Índia, Cabo Verde, México, Tailândia, Angola, Paquistão e Vietname (Alves *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2012).

O *Ae. aegypti*, vetor responsável, foi identificado na Madeira, na região de Santa Luzia, pela primeira vez, em 2005. Desde então, o vetor encontra-se disseminado um pouco por toda a ilha (Sousa *et al.*, 2012).

A localização geográfica da ilha da Madeira, perto do continente africano, possuindo um clima subtropical e com predominância de precipitação, são fatores que contribuem para a reprodução do mosquito e transmissão do DENV. Como a estação das chuvas é mais comum durante o Outono, o risco de infeção durante este período é maior (Frank, Höhle, Stark, & Lawrence, 2013).

Este surto derivou da interação entre vários fatores de risco, nomeadamente, a prevalência do mosquito, o elevado número de locais de reprodução e o comprometimento do sistema imunitário dos habitantes (Alves *et al.*, 2013).

Os pacientes infetados registaram sintomas gripais, nomeadamente febre, enxaquecas, dores retro orbitais, artralgias, mialgias, astenia, e erupções máculo-papulares. Para além destes sinais clínicos, as análises laboratoriais revelaram trombocitopenia, leucopenia e níveis elevados de transaminases. No entanto, apesar da extensão deste surto, não foram registados casos graves de dengue, havendo um decréscimo considerável da progressão da doença com o decorrer do tempo (Alves *et al.*, 2013; Domanovic *et al.*, 2012).

Os testes laboratoriais, realizados às amostras de soro recolhidas dos pacientes infetados, através de RT-PCR, revelaram a presença do serótipo 1 (Alves *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2012). Devido à elevada semelhança sequencial com os serótipos existentes na Venezuela e Colômbia, crê-se então, que a corrente transmissão do vírus teve origem na América Latina (Domanovic *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2012).

Após a ocorrência do surto foram tomadas algumas providências de modo a minimizar a transmissão, reduzir o impacto na população afetada, e prevenir a distribuição para outros países, sobretudo europeus (World Health Organization, 2012).

As primeiras medidas implementadas foram, desinfestação de todos os aviões com partidas da ilha; sistemas de monitorização de mosquitos, no aeroporto, portos, centros de saúde, e outros locais de potencial transmissão. De forma a educar a população, foi dada informação relativa à proteção pessoal contra o vetor e estratégias de erradicação dos locais reprodutivos. A campanha incluiu informação direta, ou seja, porta-a-porta, e informação indireta, através da comunicação social e internet, nas escolas, igrejas, e setores de saúde. Os viajantes para a ilha também foram notificados acerca da fisionomia da doença, suas manifestações clínicas, bem como de quais as precauções a ter em conta de modo a reduzir o risco de ser picado. As estratégias preventivas incluíram a aplicação de repelentes e a utilização de roupas que protejam da picada. Ao contrário do que acontece noutras doenças infecciosas como a malária, no caso do dengue estas medidas preventivas devem ser aplicadas principalmente durante o dia pois o *Aedes aegypti* é um mosquito diurno, possuindo maior atividade durante o amanhecer e o anoitecer. Aos profissionais de saúde foram dadas as instruções, diretrizes e conhecimentos necessários para o correto diagnóstico e gestão clínica da infeção por dengue. Por último, relativamente à segurança do sangue e hemoderivados, foram tomadas certas providências de maneira a prevenir a transmissão, evitando-se a doação de qualquer tecido biológico por parte de portadores de sintomas gripais ou de visitantes da ilha da Madeira. Para além disso, foram realizados testes de biologia molecular, nomeadamente, RT-PCR, de todo o sangue recolhido, tanto na ilha da Madeira quanto em Portugal Continental (Domanovic *et al.*, 2012; Frank *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2012).

Apesar dos esforços e medidas implementadas, prevalece o risco de introdução de outros serótipos e de desenvolvimento de novos surtos. Deste modo, para além da manutenção das estratégias adoptadas e da vigilância constante, é imperativa a descoberta de alternativas que sejam eficazes face a este flagelo (Alves *et al.*, 2013).

Capítulo 3 - Características do vetor

O vírus do dengue é transmitido de pessoa para pessoa pelos mosquitos fêmea da família *Aedes spp.* Os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* são os vetores mais eficazes e competentes. São espécies que habitam perto do Homem e estão adaptadas ao meio doméstico que o rodeia. Os artrópodes têm um ciclo flexível, alimentando-se em qualquer ambiente, tanto ao ar livre como dentro de casa, e a qualquer hora, especialmente durante o dia (Guzman & Istúriz, 2010).

A demografia, ecologia e comportamento dos vetores são afetados pelas condições meteorológicas. Para além destes, a crescente urbanização, as viagens internacionais, a pobreza e precariedade e a escassez de programas efetivos que visem ao combate, constituem parâmetros que amplificam a propagação e reemergência dos artrópodes (Guzman & Istúriz, 2010).

Características como o tempo de vida, os potenciais reprodutivos, a resposta a fatores bióticos (alimentação, existência de espécies competitivas e predadores) e fatores abióticos (características físico-químicas dos habitats das larvas, condições climáticas e ambientais, inseticidas), são essenciais para uma melhor compreensão acerca da competência destas espécies. Além disso, as interações entre estes fatores determinam o potencial proliferativo do mosquito e a sua capacidade vetorial para a transmissão do vírus (Mohamed, Hany, & Emad, 2013).

3.1 *Aedes aegypti*

O principal vetor do vírus do dengue, o *Aedes aegypti*, é um mosquito peridomiciliário, que vive no interior e exterior das habitações, próximo dos humanos. O artrópode alimenta-se essencialmente durante o dia e a sua nutrição é constituída à base de sangue (Hopp & Foley, 2001; Stoddard *et al.*, 2013).

Este inseto é antropofílico e endofílico, sendo uma espécie distribuída globalmente e proliferando maioritariamente as zonas urbanas mais pobres e precárias (Dieng *et al.*, 2012; Luz *et al.*, 2011).

Os artrópodes agregam-se especialmente ao redor das instalações humanas, dispersando-se em distâncias relativamente curtas, geralmente a menos de cem metros. Os movimentos humanos influenciam a exposição aos mosquitos *Aedes aegypti*. Assim, a mobilidade possui impacto na transmissão da infeção, influenciando os padrões de incidência e propagação do vírus (Stoddard *et al.*, 2013).

Os mosquitos *Aedes aegypti* adultos possuem um tamanho médio de 4 a 7 mm de comprimento. A superfície dorsal do tórax é rugosa, apresentando escamas esbranquiçadas, enquanto que o abdômen apresenta um tom mais escuro, entre o castanho e o preto, podendo, no entanto, conter o mesmo tipo de escamas brancas. As pernas traseiras do mosquito apresentam coloração escura e possuem manchas brancas que se assemelham a riscas (Clemons *et al.*, 2010). A figura 2 representa a aparência e características físicas do mosquito fêmea no ato da picada.



Figura 2. Fêmea adulta de *Aedes aegypti* no momento da picada. Os mosquitos apresentam escamas brancas na superfície dorsal e listas brancas nas pernas. (Retirado de: Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

Embora tanto os machos quanto as fêmeas se alimentem do néctar de plantas, as fêmeas estão adaptadas para a alimentação com sangue de vertebrados, uma vez que possuem uma espécie de “abas” bucais sugadoras (Clemons *et al.*, 2010).

A temperatura, humidade, precipitação, luz solar e velocidade do vento são fatores meteorológicos que afetam a subsistência e desenvolvimento do mosquito. O *Aedes aegypti* é um artrópode tropical, contudo consegue subsistir em condições ambientais adversas. Encontra-se difundido um pouco por todo o mundo, conseguindo habitar em regiões onde as temperaturas são muito altas ou baixas. É, igualmente, afetado pelo clima, preferindo climas com humidade e precipitação elevadas. As larvas do inseto são abundantes em regiões onde as chuvas tropicais são frequentes, pois a água da chuva armazenada, constitui um reservatório comum para a deposição dos ovos (Jansen & Beebe, 2010).

O ciclo gonotrófico é o ciclo de desenvolvimento ovário do mosquito, sendo definido como o tempo decorrido entre a ingestão de sangue, através da picada, e a postura dos ovos (Mohamed *et al.*, 2013). Este ciclo de metamorfose, dura em média dez dias e é constituído por quatro fases, que compreendem, a fase de ovo, fase larval, fase pupal e a fase adulta (figura 3). Todas estas fases decorrem em ambientes aquáticos. (Clemons *et al.*, 2010).

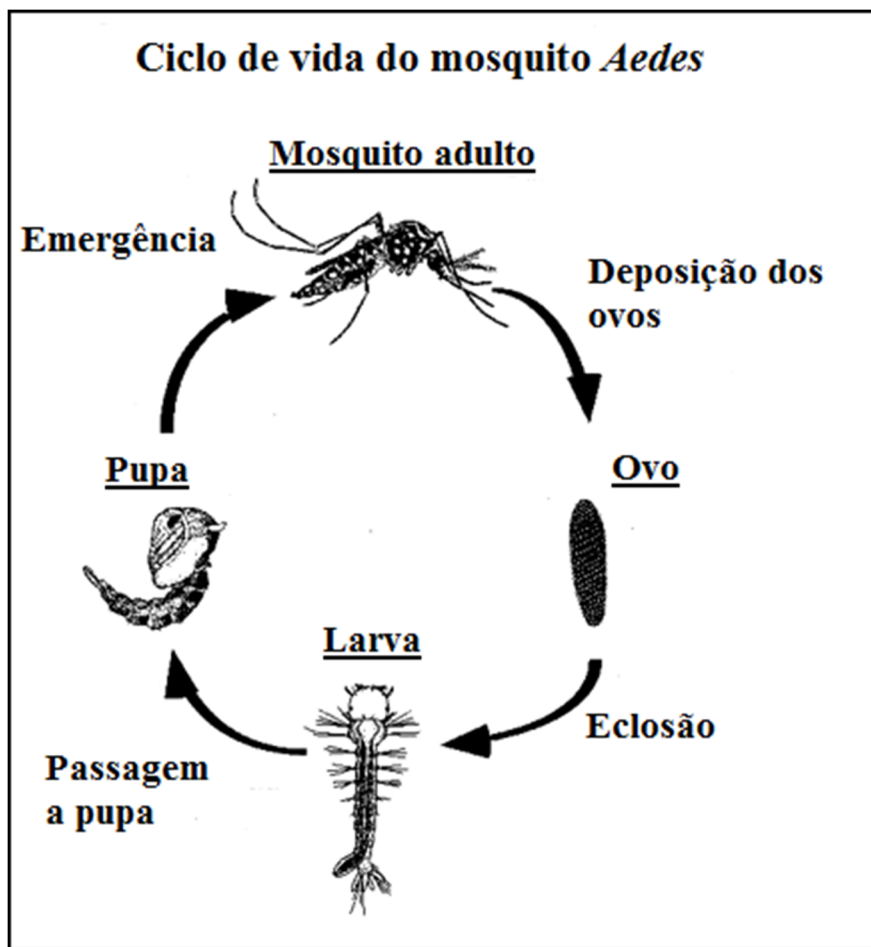


Figura 3. Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti* representando as quatro fases, fase de ovo, fase larval, fase pupal e fase adulta. (Adaptado de: Hopp & Foley, 2001).

A fecundidade do mosquito fêmea, isto é, a sua capacidade reprodutiva, pode ser aferida através da quantidade de ovos depositados, enquanto que no macho a fecundidade é mensurada por meio da competência sexual. Se a copulação for ineficaz, resultam fêmeas semi-fecundadas, comprometendo a reprodução da espécie (Mohamed *et al.*, 2013). Durante o seu ciclo de vida, as fêmeas adultas podem produzir até cinco lotes de ovos, colocando, de cem a duzentos ovos por lote. Os ovos são depositados à

superfície da água, em locais húmidos, geralmente em reservatórios como tanques, vasos e baldes, localizados sobretudo perto de habitações (Clemons *et al.*, 2010).

As larvas eclodem dos ovos após um período médio de quatro dias e meio. A temperatura é o fator determinante no crescimento e sobrevivência dos embriões, estes, desenvolvem-se mais rapidamente nos climas quentes como os encontrados nos trópicos. Para além disso, as temperaturas elevadas aceleram ainda a digestão de sangue, o que diminui a duração do ciclo gonotrófico, afetando a capacidade infecciosa do vetor, e, por conseguinte, a transmissão da doença. A humidade é, igualmente, um parâmetro essencial na oogénese, uma vez que os ovos, quando expostos a um acréscimo de humidade, eclodem mais rapidamente (Mohamed *et al.*, 2013).

Os ovos são bastante resistentes sobrevivendo por longos períodos, por vezes alguns meses, a fatores adversos como secas ou degelos, porém, assim que submergem na água, eclodem. Esta é uma das razões que leva ao difícil controlo destas espécies. Para além da temperatura e humidade, a alimentação à base de sangue interfere também na deposição dos ovos. As fêmeas de *Ae. aegypti* melhor alimentadas e, consequentemente, de tamanho acrescido, são mais férteis e competentes (Clemons *et al.*, 2010; Mohamed *et al.*, 2013).

A fase larval é composta por quatro estágios que duram em média quatro dias sendo que grande parte deste período é passado à superfície dos habitats aquáticos. As larvas alimentam-se sobretudo de algas e outros organismos microscópicos encontrados na água. A seguir ao quarto estágio, o *Aedes aegypti* entra numa fase pupal que dura cerca de dois dias, ao fim da qual atinge a maturidade (Clemons *et al.*, 2010).

O tempo médio de vida do inseto adulto varia entre duas semanas a um mês (Clemons *et al.*, 2010). Os machos geralmente vivem cerca de dez dias enquanto que as fêmeas vivem aproximadamente vinte dias. A dieta dos mosquitos influencia a sua longevidade, na medida em que, fêmeas cuja alimentação é feita à base de sangue, vivem mais tempo, relativamente às que não se alimentam desta forma. Outro parâmetro que influencia a vida do inseto é a frequência das refeições. As fêmeas de *Ae. aegypti* que ingerem sangue diariamente, vivem mais tempo do que aquelas cuja alimentação é esporádica. Contudo, a longevidade e densidade populacional do vetor podem ainda ser afetados pela existência de espécies competitivas, predadores ou inseticidas. Posto isto, o tamanho do vetor, o horário e frequência das refeições, o tipo de dieta, o tamanho da fêmea, a alimentação larval e as condições ambientais afetam significativamente a longevidade e fecundidade dos vetores (Mohamed *et al.*, 2013).

O mosquito é considerado um vetor competente por várias razões, tais como, a elevada suscetibilidade ao DENV, o habitat próximo do Homem, a alimentação diurna à base de sangue humano e a picada praticamente impercetível. Como qualquer movimento afeta a sua alimentação, e de forma a compensar a interrupção, o mosquito procura rapidamente novos alvos. Assim, num único ciclo gonotrófico, as fêmeas *Aedes aegypti* podem picar vários indivíduos (Gibbons & Vaughn, 2002; Mohamed *et al.*, 2013).

Após um período de incubação extrínseco de aproximadamente dez dias, o vírus, localizado nas células epiteliais do trato intestinal do mosquito, passa para as glândulas salivares deste. As proteínas salivares resultantes da picada do inseto promovem a infeção no alvo (Guzman *et al.*, 2010). O vírus do dengue infeta maioritariamente as glândulas salivares. Contudo, verifica-se também a presença de infeção no sistema nervoso, envolvendo o cérebro, o órgão de Johnston, o olho, e os gânglios tóraco e abdominal do mosquito (Platt *et al.*, 1997).

A transmissão ocorre na sequência da fase de incubação do artrópode, num período designado por fase de virémia. Este período dura geralmente entre quatro a cinco dias, e a partir daí o mosquito permanece infeccioso para o resto da sua vida. Por outro lado, a transmissão placentária, por transfusão sanguínea e através de transplante, é pouco frequente (Guzman & Istúriz, 2010).

O vírus parece afetar o comportamento do inseto verificando-se que os mosquitos infetados demoram mais tempo a alimentar-se do que os mosquitos normais (Luz *et al.*, 2011). Para além disto, os mosquitos fêmea infetados com o vírus do dengue apresentam um aumento de cerca de 50% na sua atividade locomotora, quando comparados com os mosquitos não infetados (Lima-Camara *et al.*, 2011).

Atualmente, o contínuo crescimento populacional, principalmente nas áreas dos trópicos, o aumento da movimentação dos vetores através da modernização da rede de transportes, e as escassas e ineficazes medidas de controlo, são algumas razões que contribuem para a propagação constante do artrópode. Apesar das condições climáticas influenciarem extensivamente a distribuição do mosquito e a epidemiologia da infeção por dengue, o comportamento das populações e as condições do ambiente doméstico, são os fatores mais importantes na eficácia das estratégias de erradicação do *Aedes aegypti* (Jansen & Beebe, 2010).

3.1.1 *Aedes aegypti* em Portugal

O primeiro caso confirmado de *Aedes aegypti* em Portugal ocorreu entre 2004 e 2005, em Santa Luzia, na Região Autónoma da Madeira. (Almeida, Gonçalves, Sousa, Melim, & Gracio, 2007). O vetor teve origem provavelmente num país da zona das Caraíbas, sendo introduzido na ilha através de viajantes infetados (Alves *et al.*, 2013).

Na região, foram tomadas medidas para controlo do vetor que contaram com a cooperação entre as autoridades e a população e incluíram, a redução dos locais de deposição dos ovos, o tratamento químico com inseticidas, e a educação populacional. Contudo, a erradicação do mosquito não apresentou os efeitos desejáveis, consequência da existência de ovos em locais de difícil acesso. Assim, o mosquito tem continuado a proliferar a região (Almeida *et al.*, 2007).

Para além da ilha da Madeira, o artrópode reside também na Holanda, Geórgia, e na fronteira desta com a Rússia. Em Portugal Continental, o mosquito foi detetado até 1956, não tendo voltado a ser descrito desde essa altura. Neste período, era também prevalente em Espanha, originário do Norte de África (Almeida *et al.*, 2007; Domanovic *et al.*, 2012)

A proliferação desta espécie de mosquitos na Europa, é favorecida pelas mudanças climáticas registadas nos últimos anos. Como resultado do aquecimento global, da crescente imigração e acréscimo de viagens para zonas endémicas, aumenta a preocupação relativamente à transmissão do vírus do dengue no continente europeu e em Portugal, em especial na região da Madeira, onde o clima presente é favorável à proliferação do *Aedes aegypti* (Almeida *et al.*, 2007; Domanovic *et al.*, 2012).

3.2 *Aedes albopictus*

O mosquito *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse), é uma espécie bastante competente, sendo o vetor de vários arbovírus, nomeadamente do vírus do dengue, inclusivé dos seus quatro serótipos (Gratz, 2004).

Apesar de transmitir o DENV, o *Ae. albopictus* é considerado um vetor menos competente do que o seu homólogo *Aedes aegypti* (Domanovic *et al.*, 2012).

Originário do Sudeste Asiático, nas últimas décadas tem-se vindo a distribuir para outros continentes como África, América e Europa. Esta expansão deve-se à forte troca comercial entre os vários continentes, particularmente, na área de negócio de pneus usados. Quando possuem água, os pneus constituem reservatórios para os ovos do *Aedes albopictus*. Os ovos do vetor podem sobreviver vários meses, mesmo na ausência

de ambientes aquosos, foco preferencial para a reprodução desta espécie. Deste modo, a distribuição do mosquito para áreas onde não habita é facilitada, podendo assim tornar-se endêmicas (World Health Organization, 2009).

Este inseto constitui um vetor importante do vírus do dengue, contudo, somente em áreas onde o *Aedes aegypti* não é predominante, como no Japão, Hawaii, Ilhas Seichelles, Ilha da Reunião, Ilhas Maldivas e algumas partes da China. Nestas regiões o *Ae. albopictus* é o vetor principal do DENV, no entanto, são zonas onde nunca ocorreram as epidemias devastadoras, características do vírus, nem as formas mais graves da doença. Nos países em que o *Ae. aegypti* é o vetor dominante, o *Ae. albopictus* age como vetor de manutenção do vírus do dengue, atuando, sobretudo, nos ciclos rurais e selvagens. Tal facto sugere a existência de competição geográfica entre os dois vetores (Añez & Rios, 2013; Delatte *et al.*, 2008; Gratz, 2004; Lambrechts, Scott, & Gubler, 2010).

Inicialmente, esta espécie reproduzia-se em ambientes florestais e rurais, porém, resultante de uma adaptação evolutiva, o *Ae. albopictus* começou a desenvolver-se nos meios urbanos, inclusive no interior das habitações. Através desta evolução, o mosquito desenvolveu a apetência para transmitir vírus patogénicos, nomeadamente o vírus do dengue. Este artrópode possui uma forte flexibilidade ecológica que lhe permite adaptar a vários ecossistemas, incluindo o meio urbano, na medida em que as fêmeas depositam os seus ovos tanto em reservatórios naturais quanto em contentores sintéticos. No ambiente urbano, os recipientes descartáveis não degradáveis constituem os locais mais favoráveis para a reprodução, contudo, no ambiente natural, os troncos de bambu e as fissuras nas rochas são os seus locais de eleição (Delatte *et al.*, 2008; Saboia-Vahia *et al.*, 2013).

Este artrópode é mais sensível à infeção intestinal, deste modo, a distribuição do vírus para outros tecidos é bastante reduzida (Lambrechts *et al.*, 2010).

O mosquito *Ae. albopictus* é definido como sendo um mordedor agressivo e oportunista, com uma vasta gama de hospedeiros vertebrados. Os alvos deste inseto incluem, pássaros, galinhas, cães, cabras, vitelas e o Homem. Alimentando-se também do sangue de outros seres, o sangue humano constitui a sua preferência. Deste modo, compõe um risco elevado para a propagação de vírus (Dieng *et al.*, 2012).

O vetor emergiu na Europa em 1970, através das exportações mundiais, principalmente do comércio de pneus. Desde essa altura, tem-se encontrado em vários países, principalmente na Itália, onde é endémico, Espanha, França, Bélgica e Suíça

(Domanovic *et al.*, 2012; Gratz, 2004). As alterações climáticas, resultantes do aquecimento global e da poluição, registados nas últimas décadas, aliadas à endemicidade do vetor noutras regiões europeias, fazem de Portugal um país de alto risco para a emergência do mosquito *Aedes albopictus* e, consequentemente, a proliferação de arboviroses (Almeida *et al.*, 2008).

A mudança na dinâmica de transmissão, assim como o aumento da disseminação global deste mosquito, são razões preocupantes, que culminam no acréscimo do risco de expansão de arbovírus, especialmente o DENV (Lambrechts *et al.*, 2010). A figura 4 apresenta uma ilustração do vetor *Aedes albopictus*. Em semelhança ao *Aedes aegypti*, este mosquito também apresenta escamas brancas na superfície dorsal e listas brancas nas patas.



Figura 4. *Aedes albopictus*, vetor do vírus do dengue e de outros arbovírus. (Retirado de: University of Management and Technology, 2013).

Capítulo 4 - Características gerais do vírus do dengue

O vírus do dengue pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. O gênero *Flavivirus* incorpora outros vírus igualmente importantes, encontrados um pouco por todo o globo. O vírus da febre amarela, vírus da encefalite japonesa, vírus do Oeste do Nilo e vírus da encefalite de St. Louis são alguns exemplos (Iglesias & Gamarnik, 2011). Todos os flavivírus possuem o mesmo conjunto de epítomos que constituem a proteína do invólucro (E). Por conseguinte, os testes serológicos resultam frequentemente em reações cruzadas entre estes vírus, o que dificulta a realização de um diagnóstico preciso (Gubler, 1998).

O DENV possui quatro serótipos antigenicamente distintos, porém, partilham aproximadamente 65% do genoma. Embora apresentem certas alterações genéticas entre si, os subtipos possuem geralmente o mesmo habitat e causam síndromes semelhantes no Homem (Halstead, 2008).

O vírus apresenta uma estrutura esférica com um diâmetro de 40 a 60 nm, sendo constituído por uma nucleocápside de simetria icosaédrica, que por sua vez se encontra revestida por um invólucro lipídico. O genoma do vírus contém uma molécula de RNA de cadeia simples e polaridade positiva com cerca de 11.000 pb de comprimento (Guzman *et al.*, 2010; Jessie, Fong, Devi, Lam, & Wong, 2004).

O genoma do DENV possui apenas uma fase de leitura aberta, *open reading frame*, (ORF), a qual codifica um polipéptido que é processado durante, e após a tradução, por proteases celulares e serinas virais. O polipéptido é sintetizado nas três proteínas estruturais e nas sete proteínas não-estruturais, na ordem C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS5. As proteínas estruturais denominam-se por, proteína da cápside (C), proteína da membrana (M) e proteína do invólucro lipídico (E) (Faheem *et al.*, 2011).

As porções terminais 5' e 3', da cadeia de RNA, constituem sequências não codificantes. A extremidade 5', fundamental para a replicação viral e síntese proteica, é metilada. Esta característica, porém, não se verifica em todos os flavivírus. Algumas propriedades do vírus, nomeadamente, a replicação viral, o tropismo vírus/célula hospedeira, a especificidade, a patogenicidade e a virulência, devem-se à atividade dos elementos constituintes da região não codificante 3' (Faheem *et al.*, 2011).

As estruturas do RNA exercem um papel fundamental na regulação de vários processos do ciclo viral, atuando como promotores, potenciadores e redutores na

transcrição, tradução, replicação do RNA e encapsidação. Para além disto, integram a resposta antiviral do hospedeiro, estimulando-a ou reprimindo-a (Iglesias & Gamarnik, 2011).

Os genomas virais são moléculas ativas que vão sofrendo rearranjos conformacionais conforme o desenvolvimento do ciclo vírico. As suas estruturas secundárias e terciárias alteram-se, respondendo desta forma às modificações do ambiente circundante da célula alvo. A dinâmica da molécula de RNA é regulada por vários elementos, nomeadamente, pelas sequências de nucleótidos e pelas interações RNA-RNA locais e de longo alcance. Não obstante o início do mecanismo de tradução ocorrer na extremidade 5', e o início do processo de replicação de RNA ocorrer na extremidade 3', os elementos cis, essenciais para o início da tradução, localizam-se na extremidade 3' do RNA viral. Por outro lado, os elementos essenciais para o início da replicação do RNA encontram-se na porção terminal 5' do genoma (Iglesias & Gamarnik, 2011).

O genoma do DENV, assim como o de outros vírus do género *Flavivirus*, apresenta sequências complementares nas extremidades 5' e 3', sequências essas que regulam a interação RNA-RNA e a ciclização do genoma (Alvarez *et al.*, 2005; Iglesias & Gamarnik, 2011).

De acordo com estudos realizados por Alvarez *et al.* (2005), as moléculas de RNA contendo sequências virais nas extremidades 5' e 3' formam estruturas circulares, enquanto que tal não se verifica em moléculas de RNA contendo deleções específicas nas sequências virais na extremidade 3'. Assim, constata-se, que a afinidade e complementaridade entre pelo menos dois pares de sequências de nucleótidos, é fundamental para a ciclização do RNA, e consequentemente, para a estabilização dos complexos RNA-RNA. As sequências complementares 5' e 3' são constituídas por aproximadamente dez nucleótidos adjacentes, sendo que destes, pelo menos oito, são semelhantes em todos os flavivírus (Alvarez *et al.*, 2005).

4.1 Origem do vírus do dengue

O vírus do dengue propaga-se através de dois ciclos, ciclo zoonótico e ciclo não zoonótico. No ciclo não zoonótico ou endémico/epidémico, a transmissão ocorre entre humanos e mosquitos das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Por outro lado, no ciclo zoonótico ou selvagem, a transmissão decorre entre primatas e outras espécies de vetores da família *Aedes spp.*, que não as referidas anteriormente (Franco *et al.*, 2011;

Halstead, 2008). A figura 5 ilustra um esquema representativo dos dois ciclos do artrópode.

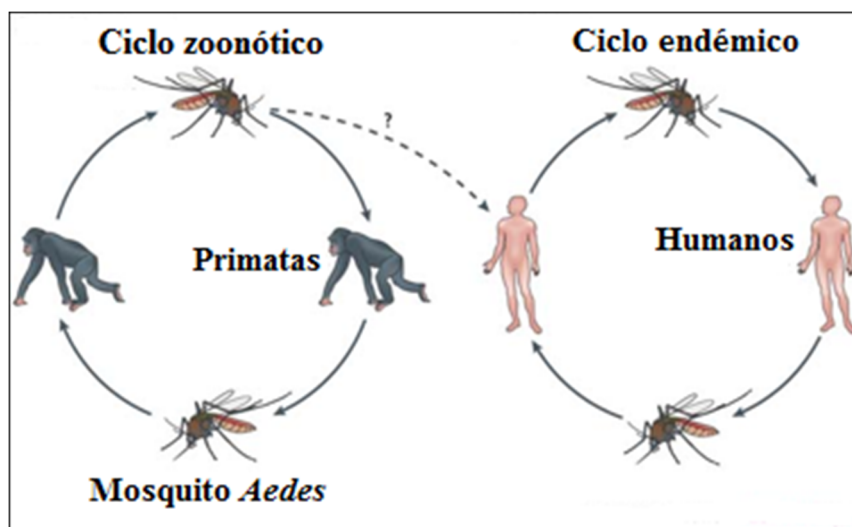


Figura 5. Ciclo zoonótico (selvagem) e ciclo endêmico (epidêmico) do vírus do dengue. (Adaptado de: Whitehead, Blaney, Durbin, & Murphy, 2007).

Os primatas são suscetíveis ao vírus do dengue desenvolvendo uma resposta imunitária, ainda assim, estas espécies não apresentam as manifestações clínicas evidentes de doença (Guzman & Istúriz, 2010).

O vírus do dengue evoluiu a partir de estirpes selvagens primitivas que utilizavam hospedeiros residentes nas florestas tropicais africanas e asiáticas (Weaver & Vasilakis, 2009; Whitehead *et al.*, 2007). As estirpes selvagens de DENV, geralmente não passam das florestas para as áreas urbanas. No entanto, pode ocorrer transmissão ocasional, em meios rurais ou ilhas, onde os focos populacionais são reduzidos (Gubler, 1998).

O ciclo zoonótico de transmissão envolve hospedeiros primatas e mosquitos da família *Aedes spp.*, contudo, não são os habituais vetores, *Ae.aegypti* e *Ae.albopictus* (Gubler, 1998; Halstead, 2008; Weaver & Vasilakis, 2009). Nas florestas tropicais, o vírus manteve-se por meio de transmissão vertical/transovarial no artrópode, realizando, posteriormente, uma amplificação intermitente nos primatas (Gibbons & Vaughn, 2002).

De modo a confirmar a teoria das estirpes provenientes de habitats selvagens, surgiram estudos que demonstraram que estas linhagens eram diferentes de todas as outras (Weaver & Vasilakis, 2009). Na África Ocidental, estudaram-se os ciclos de

transmissão das estirpes selvagens do vírus do dengue. O DENV-2 tem sido encontrado na região desde os anos 70, manifestando-se predominantemente no Senegal, Guiné, Costa do Marfim e Burkina Faso (Franco *et al.*, 2011; Halstead, 2008). Este serótipo foi isolado a partir de várias espécies da família *Aedes spp.*, nomeadamente *Aedes africanus*, *Aedes leuteocephalus*, *Aedes opok*, *Aedes taylori* e *Aedes furcifer* (Franco *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2000). Os isolados indígenas, provenientes dos ciclos zoonóticos africanos, apresentam diferenças ecológicas e genéticas, relativamente aos isolados endêmicos, provenientes de meios urbanos. As estirpes selvagens do DENV-2 diferem em cerca de 19% nas suas sequências nucleotídicas, o que leva a crer que estas linhagens são evolutivamente distintas (Wang *et al.*, 2000; Weaver & Vasilakis, 2009).

Na Malásia, os quatro serótipos de dengue foram isolados a partir dos vetores *Aedes niveus* e de primatas (Franco *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2000; Weaver & Vasilakis, 2009). Os isolados de DENV-1, DENV-2 e DENV-4, provenientes de linhagens indígenas asiáticas, também revelaram diferenças em relação aos isolados endêmicos, e relativamente aos isolados selvagens de origem africana. As estirpes selvagens de DENV-2 da Malásia divergem das estirpes epidémicas em cerca de 17% enquanto que os isolados de DENV-1 e DENV-4 diferem das linhagens endêmicas em cerca de 7% e 14% respetivamente (Wang *et al.*, 2000; Weaver & Vasilakis, 2009).

A maior divergência das estirpes primitivas selvagens na Malásia em relação às de África demonstra que o antepassado de todos os serótipos de DENV emergiu na região asiática, evoluindo, com o passar dos anos, para os quatro serótipos descritos hoje em dia. Esta evolução envolveu também a adaptação dos vetores do vírus e dos hospedeiros. Inicialmente o ciclo do DENV constituía mosquitos de várias espécies da família *Aedes spp.*, que foram substituídos posteriormente pela espécie *Aedes albopictus* e por fim pela espécie *Aedes aegypti*. Como primordialmente o mosquito *Ae. aegypti* não era prevalente na Ásia e Oceânia, acredita-se que o *Ae. albopictus*, ou outros mosquitos *Aedes*, possivelmente seriam os vetores primitivos. Com origem africana, o vetor *Aedes aegypti* propagou-se para outras áreas do globo em consequência da forte expansão comercial nos trópicos, decorrida há alguns séculos atrás. Apesar de o serótipo 3 não ter sido isolado pelos investigadores, foram encontrados anticorpos em amostras serológicas provenientes de primatas, o que leva a crer que na região da Malásia existia igualmente um ciclo zoonótico de DENV-3 (Wang *et al.*, 2000; Weaver & Vasilakis, 2009).

A escassa concentração populacional da forma indígena do DENV, designa que era primitiva e que as formas endêmicas/epidêmicas progrediram a partir de populações urbanas que se tornaram hospedeiros adequados para o vírus. Assim, verifica-se que os quatro serótipos endêmicos de DENV, evoluíram a partir de ancestrais selvagens (Wang *et al.*, 2000).

Conclui-se que os quatro serótipos de dengue resultaram da evolução de um serótipo ancestral comum. O período de isolamento, associado à constante sucessão de alterações na transcrição do RNA viral e da diferenciação nas proteínas do invólucro, são fatores que conduziram aos subtipos encontrados hoje em dia, permitindo que se formasse um ciclo de transmissão urbano (Halstead, 2008).

4.2 Serótipos

O vírus do dengue possui quatro serótipos genética e antigenicamente distintos, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Estes são constituídos por diversos genótipos com repercussão na infeção e distribuição geográfica, ligeiramente diferentes (Weaver & Vasilakis, 2009).

4.2.1 DENV-1

Atualmente, e de acordo com análises filogenéticas que são baseadas nas sequências de nucleótidos, considera-se que o DENV-1 possui cinco genótipos que possuem uma divergência nucleotídica de apenas 6%. Estes são, o genótipo I, constituído por estirpes originárias do Sudeste Asiático, China e África Oriental; o genótipo II com estirpes da Tailândia; o genótipo III contendo linhagens de origem selvagem, provenientes da Malásia; o genótipo IV representado por estirpes da Austrália e Ilhas a Oeste do Pacífico; e o genótipo V contendo todas as estirpes do continente americano, estirpes da África Ocidental e algumas estirpes da Ásia (Weaver & Vasilakis, 2009).

Este serótipo foi o causador do surto ocorrido na Ilha da Madeira em 2012. O DENV-1 é prevalente em países como Brasil e Angola, e como nestes países existe uma elevada afluência de viajantes portugueses, sobretudo através da imigração que se tem vindo a registar nos últimos anos, a preocupação acerca da ocorrência de possíveis infeções em Portugal, é constante (Alves *et al.*, 2013; Domanovic *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2012).

4.2.2 DENV-2

Tal como o serótipo 1, também o serótipo 2 possui cinco genótipos distintos. O primeiro genótipo designa-se por genótipo asiático e subdivide-se em tipo 1 e tipo 2. O genótipo asiático tipo 1 é constituído por linhagens com origem na Malásia e Tailândia, enquanto que o genótipo asiático tipo 2 representa estirpes do Vietname, China, Taiwan, Sri Lanka e Filipinas. O segundo genótipo do DENV-2, designado por genótipo cosmopolita, apresenta estirpes de distribuição global, incluindo Austrália, África Oriental e Ocidental, Ilhas do Pacífico e do Índico, Médio Oriente e Índia. O terceiro genótipo chama-se genótipo americano e é constituído por estirpes da América Latina e estirpes ancestrais com origem nas Caraíbas, Índia e Ilhas do Pacífico. O genótipo IV designa-se por genótipo do sudeste asiático/americano e é representativo de linhagens da Tailândia e Vietname e estirpes recolhidas em todo o continente americano. Por último, o quinto genótipo é o genótipo indígena, apresentando isolados provenientes dos ciclos entre humanos, mosquitos e primatas, na África Ocidental e Sudeste da Ásia, nomeadamente da região da Malásia (Weaver & Vasilakis, 2009).

4.2.3 DENV-3

Em conformidade com estudos filogenéticos estão descritos quatro genótipos para o DENV-3. O genótipo I possui estirpes originárias da Indonésia, Malásia, Filipinas e das Ilhas do Sul do Pacífico. O genótipo II apresenta linhagens provenientes da Tailândia, Vietname e Bangladesh. O genótipo III é constituído por isolados do Sri Lanka, Índia, África, Samoa e Tailândia. E finalmente, o genótipo IV representa estirpes com origem de Porto Rico, América Central, América Latina e Taiti. Apesar destas, existem também estirpes indígenas do serótipo 3 na Malásia, contudo, até aos dias de hoje ainda não conseguiram ser isoladas (Weaver & Vasilakis, 2009).

4.2.4 DENV-4

As linhagens pertencentes ao serótipo 4 demonstram uma conservação de sequências na ordem dos 96-100%, enquanto que os outros serótipos de DENV apresentam 92% de conservação das sequências de aminoácidos da proteína E. Constituem-se quatro genótipos distintos importantes. O genótipo I apresenta estirpes provenientes do continente asiático, particularmente, da Tailândia, Filipinas, Sri Lanka e Japão. O genótipo II possui linhagens com origem na Indonésia, Malásia, Taiti, América e Caraíbas, encontrando-se bem disseminado nesta área, desde a sua

introdução no início dos anos 80. O genótipo III resulta de estirpes provenientes da Tailândia, estirpes essas que são diferentes de outros isolados tailandeses. Por último, o genótipo IV representa as linhagens selvagens com origem na Malásia. A existência de uma recombinação intra-serotípica entre os genótipos do DENV-4, resultante de linhagens ancestrais, contribuiu para o aparecimento de um genótipo diferente, que apresenta todas as estirpes provenientes da Malásia (Weaver & Vasilakis, 2009).

4.3 Glicoproteínas virais

No retículo endoplasmático rugoso sucede-se a tradução da cadeia ORF, deste processo resultando um longo e volumoso precursor polipéptido, também denominado de poliproteína. Esta poliproteína, é clivada na porção N-terminal da cadeia, dando origem a várias proteínas maduras (Henchal & Putnak, 1990; Iglesias & Gamarnik, 2011).

O genoma viral codifica dez proteínas que derivam do precursor polipéptido. Destas, três são proteínas estruturais e sete são proteínas não-estruturais (Henchal & Putnak, 1990). A figura 6 representa esquematicamente a constituição do genoma de RNA viral, apresentando as dez proteínas virais e indicando as suas respetivas funções na síntese do DENV.

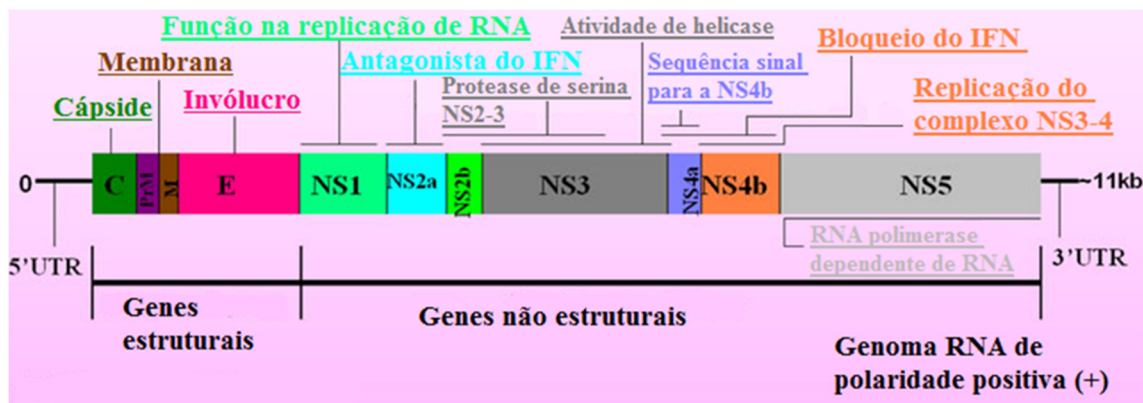


Figura 6. Organização do genoma de RNA viral, constituído pelas proteínas estruturais e não estruturais e suas respetivas funções na replicação do RNA. (Adaptado de: Faheem *et al.*, 2011).

As proteínas estruturais incluem a glicoproteína da cápside (C), a glicoproteína da membrana (M) e a glicoproteína do invólucro (E), e têm como função formar o revestimento do vírus, sendo também responsáveis pela integração do RNA viral na célula hospedeira (Goodsell, 2008; Guzman *et al.*, 2010).

A glicoproteína estrutural da cápside é a primeira a ser codificada durante a síntese proteica da poliproteína. A glicoproteína C não possui a porção N-terminal, contudo, é uma proteína cuja composição à base de resíduos de Arginina e Lisina na porção C-terminal, lhe confere um carácter hidrofóbico (Henchal & Putnak, 1990). As cópias da proteína C estabelecem uma cápside à volta do genoma RNA, formando a nucleocápside viral, e conferindo assim, a forma esférica característica do vírus (Faheem *et al.*, 2011). A nucleocápside, por sua vez, está envolvida por uma membrana lipídica e por aproximadamente 180 cópias da proteína E, ligadas à superfície da membrana através de um segmento transmembranar que forma uma espécie de “âncora” (Goodsell, 2008).

O vírus, na sua forma imatura possui uma proteína designada por pré-M ou prM, que é um precursor da proteína M. Durante a maturação viral, ocorre clivagem da prM glicosilada, por ação de uma protease do tipo furina, dando origem à proteína M. Este passo é essencial, sendo a etapa terminal na morfogénese do virião. Por conseguinte, a estrutura do vírus, outrora possuindo heterodímeros E-prM na superfície, é reorganizada, o que conduz a um acréscimo na sua infectividade, contribuindo deste modo para a replicação viral. A proteína M, em conjunto com a proteína E, constituem o invólucro viral e atuam na produção de viriões maduros (Clyde, Kyle, & Harris, 2006; Faheem *et al.*, 2011; Henchal & Putnak, 1990).

O invólucro lipídico é essencial para a proteção do genoma viral, dado que a nucleocápside constitui uma estrutura ténue, permeável a ribonucleases. O carácter protetor do invólucro faz com que interaja também com as membranas celulares hospedeiras, durante o mecanismo de fusão viral (Henchal & Putnak, 1990).

A proteína do invólucro (E), constitui um trímero à superfície dos viriões maduros, encontrando-se nos viriões imaturos sob a forma de heterodímeros E-prM (Henchal & Putnak, 1990). Esta proteína é responsável por propriedades fundamentais do DENV, nomeadamente a ligação ao recetor membranar, a hemaglutinação de eritrócitos e a indução de anticorpos e da resposta imunitária (Guzman *et al.*, 2010). Como a proteína E é o principal constituinte antigénico do vírus do dengue, é contra ela que os anticorpos são produzidos. Ainda assim, o maior envolvimento da proteína E é promover a ligação entre o vírus e a célula hospedeira, por meio de recetores celulares, como o recetor de sulfato de heparina e o DC-SIGN. Esta glicoproteína do invólucro, localizada à superfície do vírus, apresenta uma forma tridimensional, sendo constituída por três domínios antigénicos, o domínio estrutural I e os domínios de ligação II e III.

O domínio I, localizado centralmente, possui uma função basicamente estrutural, enquanto que, o domínio II, desempenha a função de unir o domínio estrutural I ao domínio de ligação III, que é o maior domínio de ligação do vírus. O domínio II possui a região de dimerização e o péptido de fusão, que está localizado na extremidade distal deste domínio. O domínio III contém o local de ligação ao recetor, promovendo a atividade de interação com o recetor da célula alvo. Entre os domínios II e III existe uma região dobrável, designada de “*kl loop*”, que atua na alteração conformacional que ocorre antes da fusão (Bäck & Lundkvist, 2013; Clyde *et al.*, 2006; Faheem *et al.*, 2011; Gubler, 1998).

Quando o DENV se encontra na fase infecciosa, a proteína do invólucro, à superfície do vírus, constitui um revestimento liso com simetria icosaédrica. No entanto, quando o vírus é transportado para dentro da célula alvo, o meio ácido dos lisossomas leva a proteína a assumir um formato diferente, agregando-se em forma de “espigão” trimérico, como representado na figura 7. Os vários aminoácidos hidrofóbicos, localizados no vértice do “espigão”, representados na figura a cor vermelha, inserem-se na membrana lisossomal provocando a fusão da membrana do vírus com o lisossoma. Este fenómeno faz com que haja libertação do RNA viral dentro da célula, iniciando-se assim o processo de infeção (Goodsell, 2008).

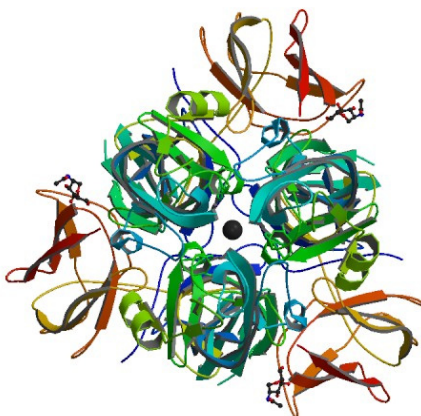


Figura 7. Conformação trimérica da proteína E após entrada do vírus na célula hospedeira (Retirado de: Modis, Ogata, Clements, & Harrison, 2012).

As restantes proteínas, não-estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, são importantes para a replicação do RNA viral, arquitetando a formação de novos

vírus aquando a sua entrada dentro da célula alvo (Goodsell, 2008; Guzman *et al.*, 2010).

A primeira proteína não estrutural, NS1, é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso (RER), resultando numa glicoproteína monomérica hidrofílica. Posteriormente, a NS1 desenvolve a estrutura de dímero não covalente, sendo mais hidrofóbica do que a estrutura monomérica precedente (Henchal & Putnak, 1990). Devido à sua localização privilegiada no local de replicação do RNA viral, a glicoproteína desempenha uma função importante nesse mesmo mecanismo (Faheem *et al.*, 2011). Para além da sua localização, o facto da NS1 sofrer glicosilação em dois locais da sua estrutura, contribui de igual modo para a replicação viral (Clyde *et al.*, 2006).

A região codificante NS2 apresenta duas proteínas distintas, NSA e NSB. A NS2A é uma proteína hidrofóbica com vários domínios transmembranares. É uma proteína fundamental na replicação do RNA, na medida em que uma pequena mutação nesta proteína bloqueia a produção de novos vírus. Para além de atuar na replicação viral, a NS2A também atua como antagonista do interferão, inibindo o seu sistema de sinalização. A NS2B é uma proteína hidrofóbica que age como cofator para a protease de serina NS2B-NS3, enzima que regula a síntese do polipéptido (Faheem *et al.*, 2011).

A NS3 é uma proteína hidrofílica multifuncional que está envolvida na replicação do genoma viral, e que atua como catalizador de várias atividades enzimáticas. Possui um domínio na porção N-terminal que lhe permite a atividade de protease de serina no complexo NS2B-NS3, constitui atividade de helicase no domínio central e atividade de NTPase na porção C-terminal. As funções de NTPase e helicase promovem a tradução do RNA do vírus, enquanto que a atividade de protease de serina no complexo NS2B-NS3, é muito importante para a clivagem do polipéptido, e, consequentemente, para a replicação viral (Faheem *et al.*, 2011).

A NS4A e NS4B são proteínas hidrofóbicas que atuam na replicação viral. A NS4A forma um componente que promove a formação do complexo vírus-célula alvo. A região C-terminal desta proteína, atua como sequência sinalizadora para a tradução da proteína adjacente, NS4B, no retículo endoplasmático. A função da proteína NS4B é gerir a replicação do vírus por meio da sua relação com a proteína NS3 (Faheem *et al.*, 2011). As glicoproteínas NS4A e NS4B, em conjunto com a glicoproteína NS2A, atuam no processo de obstrução do sinal de transdução do interferão. A NS4B é um inibidor efetivo do IFN β e IFN γ (Clyde *et al.*, 2006).

Por último, a NS5, a maior glicoproteína não estrutural, é constituída por uma sequência composta pelos aminoácidos Glicina-Aspartato-Aspartato. Esta sequência de aminoácidos é comum a todas as RNA polimerases, o que faz com que a proteína disponha de atividade de RNA polimerase dependente de RNA (Henchal & Putnak, 1990). Para além da replicação do genoma, a proteína NS5 está também envolvida na síntese de RNA, nomeadamente na modificação da sequência 5', por ação das suas metiltransferases (Faheem *et al.*, 2011; Henchal & Putnak, 1990; Weaver & Vasilakis, 2009). A ação da NS5 na síntese de RNA, deve-se particularmente à interação com a NS3, estimulando a atividade enzimática da NTPase e da RNA trifosfatase desta proteína. Para além destas, outra função da proteína NS5 constitui a intervenção na resposta antiviral celular, na medida em que se liga à molécula transdutora de sinal e activadora da transcrição, STAT 2, induzindo assim a sua degradação (Iglesias, Filomatori, & Gamarnik, 2011).

4.3.1 Importância da glicoproteína E na patogénese viral

A glicoproteína E possui um papel fulcral na patogénese viral, na medida em que afeta a ligação ao recetor, promovendo a endocitose e a entrada do vírus na célula hospedeira. Esta proteína é o alvo principal da resposta imunitária, nomeadamente da imunidade humoral (Bäck & Lundkvist, 2013).

A entrada do DENV na célula ocorre assim que a glicoproteína E, localizada à superfície da membrana viral, estabelece a ligação com o recetor celular. Após a ligação ao recetor, a proteína sofre uma alteração estrutural irreversível devido à acidez do endossoma. O ectodomínio E, de estrutura tridimensional dimérica, exhibe uma conformação diferente da anterior, passando a apresentar uma estrutura trimérica. Este rearranjo conformacional leva a que ocorra fusão do invólucro viral com as membranas plasmáticas da célula alvo, sendo o passo fundamental do mecanismo de entrada dos vírus dentro das células. (Goodsell, 2008; Modis, Ogata, Clements, & Harrison, 2004).

Portanto, verifica-se, que a pH ácido, os dímeros da proteína E sofrem dissociação e ligam-se aos lipossomas, formando trímeros. Os trímeros, com o aspeto de “bastões cónicos”, com 70-80 Å de comprimento e 30-50 Å de diâmetro, possuem o seu eixo longo perpendicular à membrana e a sua extremidade distal localizada lateralmente. Estas estruturas triméricas, formam, frequentemente, uma camada contínua que se aglomera à superfície do lipossoma (Modis *et al.*, 2004).

A glicoproteína na sua forma trimérica, apresenta subunidades, designadas de “*loops*” e constituídas por sequências de resíduos aminoácidos hidrofóbicos que são responsáveis pela atividade de fusão da membrana do vírus com o lisossoma da célula hospedeira (Allison, Schlich, Stiasny, Mandl, & Heinz, 2001).

Os três aminoácidos constituintes do “*loop*” de fusão, Triptofano 101, Leucina 107 e Fenilalanina 108, localizados na porção terminal do trímero, formam uma concavidade de bordo hidrofóbico que permite a inserção na membrana celular. Os resíduos hidrofílicos circundantes, igualmente constituintes da proteína, limitam a inserção na parte proximal da bicamada lipídica, e assim, todo o ectodomínio da proteína, enrola sobre si, direcionando a concavidade membranal viral para o “*loop*”. A fusão do invólucro viral com a membrana do endossoma, liberta o genoma viral no citoplasma da célula alvo e, deste modo, inicia-se o processo de síntese proteica no RER (Modis *et al.*, 2004).

4.4 Síntese do RNA viral

A entrada do vírus na célula alvo dá-se através de endocitose mediada por recetor. Como consequência do pH ácido presente no endossoma, ocorre fusão das membranas, mediada pelas glicoproteínas virais, que faz com que haja libertação do RNA viral para o citoplasma da célula hospedeira (Bäck & Lundkvist, 2013; Iglesias & Gamarnik, 2011). A síntese inicia-se com a degradação da cadeia de RNA de polaridade negativa, que serve como molde para a amplificação do RNA positivo. Esta reação é catalisada pela atividade da enzima RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) da proteína viral NS5, em associação com a protease/helicase da proteína NS3, com outras proteínas não estruturais e com fatores do hospedeiro. De acordo com o modelo atual, a polimerase viral liga-se ao promotor nuclear SLA, na extremidade 5’ do genoma (Iglesias & Gamarnik, 2011). Esta molécula promotora, designada de *stem-loop A* (SLA), constitui uma das duas estruturas do RNA. O promotor SLA localiza-se na região não codificada (UTR), da extremidade 5’ do genoma viral. A outra estrutura de RNA, o *stem-loop B* (SLB), possui uma sequência que complementa uma porção integrante da UTR, na extremidade 3’. Esta sequência, por sua vez, atua nas interações RNA-RNA de longo alcance, e na ciclização do RNA (Iglesias *et al.*, 2011).

A interação da sequência SLA com a RdRp é fundamental para a síntese de RNA e para a replicação viral, nas células infetadas pelo vírus do dengue. O promotor SLA une-se especificamente à RdRp viral, promovendo a síntese de cerca de 11.000

nucleótidos na porção terminal 3' do genoma. A ocorrência de mutações na sequência SLA é necessária para a replicação viral, contribuindo deste modo, para a formação de um complexo estável com a RdRp, promovendo a sua ativação (Filomatori, Iglesias, Villordo, Alvarez, & Gamarnik, 2011).

A atividade da RNA polimerase é induzida, e portanto, por ciclização do genoma, ocorre reposicionamento do complexo SLA-RdRp para perto do local de iniciação, na extremidade 3'. A ciclização do genoma, mediada pelas interações entre o RNA e o RNA de longo alcance, é crucial para a disposição do complexo, próximo do sítio de iniciação. As duas conformações adotadas pelo genoma viral e o equilíbrio entre as duas, são essenciais para a síntese do RNA do DENV (Filomatori *et al.*, 2011; Iglesias & Gamarnik, 2011). A figura 8 representa esquematicamente o modelo de síntese de RNA, descrito anteriormente.

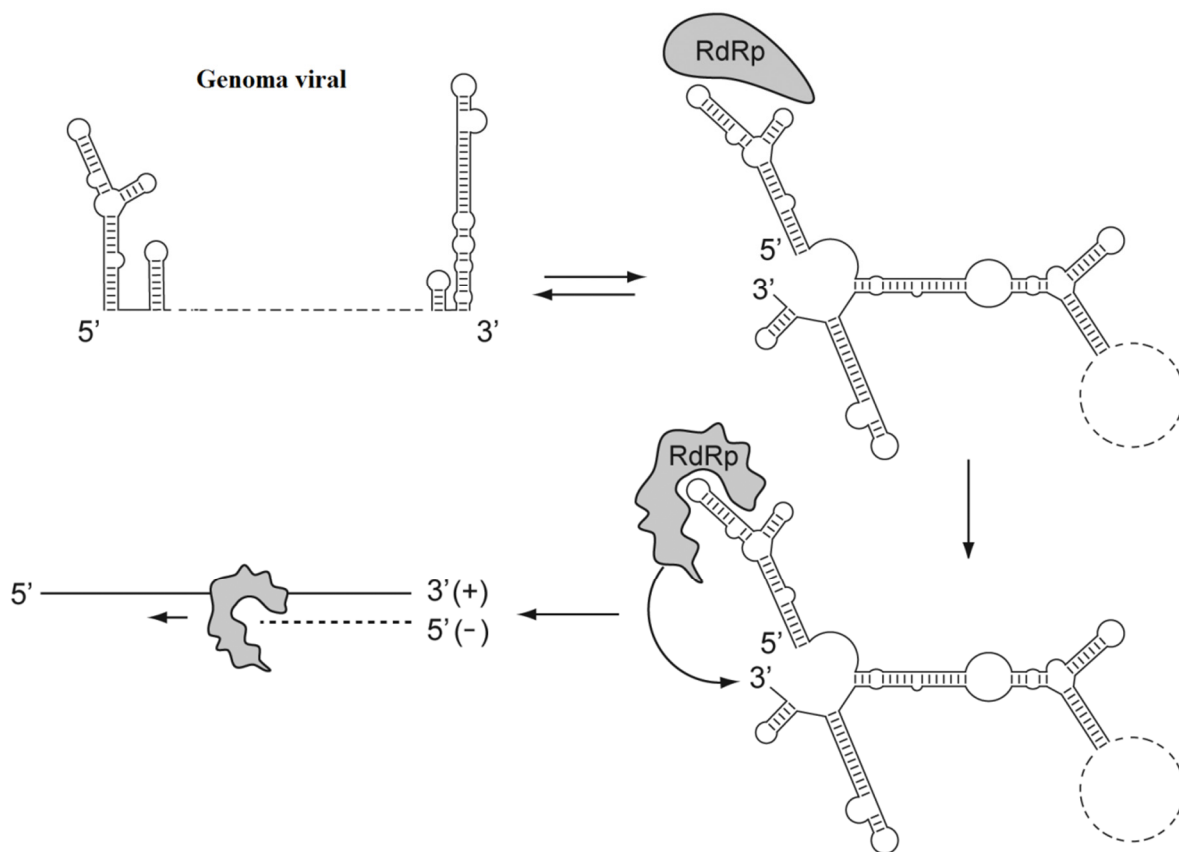


Figura 8. Modelo da síntese de RNA do vírus do dengue. (Adaptado de: Iglesias & Gamarnik, 2011).

4.5 Entrada do vírus na célula hospedeira

O vírus é transmitido para a corrente sanguínea do hospedeiro suscetível, através da mordida do vetor *Aedes aegypti*. O DENV infeta a célula alvo, iniciando, deste modo, a sua replicação (Faheem *et al.*, 2011).

Através da picada do mosquito, o vírus do dengue passa para a pele infectando células dendríticas, particularmente as células de Langerhans imaturas. A infecção ocorre por meio do recetor não integrino, captador da molécula de adesão intercelular 3, específica das células dendríticas (DC-SIGN), que interage com a glicoproteína viral E. Como consequência do processo infeccioso, as células de Langerhans infectadas sofrem maturação e migram dos tecidos periféricos para os gânglios linfáticos, onde, interagindo com os linfócitos T, vão iniciar uma resposta imunológica específica (Clyde *et al.*, 2006; Guzman *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2000).

Segundo experiências realizadas por Wu *et al.* (2000), a infecção das células dendríticas é mais efetiva do que a infecção de outras células, nomeadamente linfócitos e monócitos. Como estas células da pele são muito suscetíveis à propagação do vírus, acredita-se serem o alvo inicial da infecção.

Para além do recetor DC-SIGN, existem outros possíveis recetores para a endocitose viral. Algumas glicoproteínas como o sulfato de heparina, o recetor de manose ou a molécula lectina tipo C (CLEC5A), estão implicados no processo de entrada do vírus na célula (Bäck & Lundkvist, 2013).

Apesar de infectar a pele, o vírus do dengue dissemina-se também a outros tecidos, essencialmente, ao fígado, baço, nódulos linfáticos, timo, pulmão, rim e sangue. No fígado, as células do parênquima hepático, nomeadamente células de *Kupffer* e células endoteliais sinusoidais são as mais afetadas. No baço, os macrófagos e as células linfóides apresentam antígenos virais. No pulmão, as células endoteliais e os macrófagos são as células mais atingidas. No rim, o vírus afeta maioritariamente os túbulos renais. Em amostras sanguíneas a presença de antígenos virais verificou-se em células mononucleares fagocíticas, tais como monócitos e linfócitos. Ainda assim, o simples aparecimento de antígenos virais no interior destas células, principalmente das células mononucleares fagocitárias, não implica que estas sustentem o processo de replicação do vírus. Os antígenos virais podem provir de vírus fagocitados, destruídos, ou mesmo de complexos imunes que são captados no processo de degradação. Por outro lado, tecidos da tiróide, pâncreas, coração, glândula adrenal, músculo esquelético, intestino e cérebro não parecem ser tão afetados pelo vírus (Jessie *et al.*, 2004).

Capítulo 5- Classificação da infecção por DENV

Desde a década de 70, que os casos clínicos de dengue têm sido classificados como febre do dengue ou febre hemorrágica do dengue. Com o decorrer dos anos, este modelo de classificação, implementado pela Organização Mundial de Saúde, sofreu várias críticas ao nível da sua complexidade, utilidade e aplicação. Desde modo, em 2009, a OMS apresentou uma nova classificação, que é a utilizada nos dias de hoje. De acordo com a classificação atual, os pacientes infetados pelo DENV são distribuídos conforme as suas manifestações clínicas. Assim, possuem dengue ou dengue grave (Simmons, Farrar, Van Vinh Chau, & Wills, 2012; Srikiatkachorn *et al.*, 2011).

O modelo de classificação anterior, considerava que para um paciente possuir febre do dengue teria de apresentar pelo menos dois sintomas, para além das habituais manifestações febris. Os sintomas incluíam, náuseas, vômitos, enxaquecas, artralgias, mialgias, dores retro-orbitais, erupções cutâneas, hemorragias e leucopénia. O facto destas manifestações clínicas não serem específicas e objetivas, implicava, por vezes, a realização de testes confirmatórios da infecção pelo DENV, o que nem sempre era exequível. Por outro lado, para definir uma infecção em febre hemorrágica do dengue, eram considerados quatro fatores principais, febre, hemorragias, trombocitopénia e extravasamento plasmático. Na classificação da FHD não era necessária a realização de ensaios laboratoriais de diagnóstico, considerando-se os quatro elementos como específicos deste síndrome (Srikiatkachorn *et al.*, 2011).

Atualmente, os pacientes infetados que recuperam sem complicações são classificados como possuindo dengue. Estes doentes apresentam sintomas semelhantes aos da classificação tradicional de febre do dengue, referidos anteriormente. Em contrapartida, indivíduos que apresentem manifestações clínicas mais delicadas são definidos como tendo dengue grave. Os pacientes com dengue grave apresentam sinais de comprometimento vascular, que geralmente, resultam em choque, falha respiratória, hemorragias graves, ou disfunção múltipla de órgãos. Esta falência nos órgãos, conduz ao aumento das enzimas hepáticas (transaminases), insuficiência cardíaca ou perda de consciência (Simmons *et al.*, 2012; Srikiatkachorn *et al.*, 2011).

A melhor compreensão de manifestações clínicas, como o extravasamento plasmático, contribui para uma atuação mais rápida no período de defervescência, que culmina na redução da mortalidade associada aos síndromes mais graves, em parte devido ao contributo da classificação (Srikiatkachorn *et al.*, 2011).

Capítulo 6 - Fisiopatologia da infecção por DENV

A fase de virémia inicia-se ligeiramente antes do aparecimento das manifestações clínicas, o que culmina no início da infecção pelo vírus do dengue. Os sinais da doença surgem entre 2 a 14 dias após a mordida do mosquito, imediatamente a seguir ao período de incubação (Faheem *et al.*, 2011).

A doença inclui três fases principais que incluem, uma fase febril inicial, uma fase crítica durante o período de defervescência e uma fase de recuperação espontânea (Simmons *et al.*, 2012; World Health Organization, 2009). Estas três fases, assim como as suas possíveis consequências, encontram-se representadas na tabela 3.

Tabela 3. Fases da infecção pelo vírus do dengue e suas consequências para o hospedeiro. (Adaptado de: World Health Organization, 2009).

Fases	Consequências
Fase febril	Desidratação; distúrbios neurológicos e convulsões febris (ocasionais em crianças)
Fase crítica	Choque resultante do extravasamento plasmático; quadro de hemorragias graves; comprometimento das funções dos órgãos
Fase de recuperação	Hipervolemia (apenas ocorre em consequência a uma excessiva terapêutica de reposição de fluidos)

A fase inicial dura geralmente entre 3 a 7 dias e é dominada por manifestações febris, de recuperação espontânea e carácter auto-limitado, que raramente conduzem a complicações graves. É um período caracterizado por temperaturas superiores a 38,5 °C, em conjunto com sintomas como, enxaquecas, náuseas, vômitos, artralguas, mialgias, rubor facial, dor retro-ocular e alterações conjuntivais. Os resultados laboratoriais incluem leucopenia e trombocitopenia, acompanhados de um leve acréscimo nos níveis de aminotransferases hepáticas (Faheem *et al.*, 2011; Simmons *et al.*, 2012).

Durante o período de defervescência, em alguns pacientes como crianças e adultos jovens são frequentemente descritos síndromes de extravasamento vascular sistémico. Estes síndromes destacam-se devido ao aumento na concentração dos eritrócitos, hipoproteinemia e ocorrência de ascite. Entre a fase febril e a fase de defervescência, o profissional de saúde deve avaliar cuidadosamente os sintomas que demonstrem a evolução para um quadro de perda vascular acentuada. Como neste período é comum o desenvolvimento de manifestações hemorrágicas, a vigilância é

fundamental. O período de defervescência é o período mais crítico da infecção pelo DENV. É durante esta altura que as complicações mais graves se podem desenvolver, nomeadamente o síndrome de choque, como consequência de um volume plasmático muito reduzido. Na fase de recuperação, os pacientes revelam um cansaço acentuado, resultante das várias fases da doença. (Simmons *et al.*, 2012).

A infecção por qualquer um dos quatro serótipos do vírus do dengue pode ser assintomática, ou apresentar um quadro de manifestações clínicas diversas, que podem ser leves, no caso da febre do dengue (FD), ou que podem agravar-se e conduzir a um quadro clínico severo como a febre hemorrágica do dengue (FHD) e o síndrome de choque do dengue (SCD). Num quadro clínico de febre do dengue os sintomas mais comuns compreendem, febre que pode ir dos 5 aos 7 dias, cefaleia, mialgia, artralgia, exantema, dores musculares intensas, cansaço interno, erupções cutâneas e leucopenia. Porém, para além destas características clínicas podem também ser evidenciadas manifestações hemorrágicas e trombocitopenia. Em casos raros, a FD pode ter complicações hemorrágicas significativas que podem mesmo ser fatais (Guzman & Istúriz, 2010; Kalayanarooj *et al.*, 2007; World Health Organization, 2009).

No início da fase febril da febre hemorrágica do dengue, as manifestações clínicas são semelhantes às experienciadas na febre do dengue, contudo, no período de defervescência, os pacientes progridem para um estado clínico caracterizado por extravasamento de plasma. Esta complicação contribui para o aumento da permeabilidade vascular, assim como para a alteração da hemostase (Kalayanarooj *et al.*, 2007). O aumento na permeabilidade dos vasos sanguíneos deve-se à ativação das proteínas do sistema complemento, C3 e C5. Contudo, para além destas, outros fatores imunológicos como é o exemplo das citocinas, também estão envolvidos neste processo. As interleucinas IL8 e IL6 e o interferão gama (IFN γ) contribuem para o aumento do extravasamento plasmático (Faheem *et al.*, 2011).

Na FHD alguns órgãos apresentam hemorragias, os tecidos cutâneos, fígado e trato gastrointestinal constituem alguns exemplos. A proteína não estrutural NS1 está envolvida na patogénese das manifestações hemorrágicas. Esta glicoproteína, conduz à criação de anticorpos, que atuam reativamente contra as plaquetas, impedindo a sua agregação (Faheem *et al.*, 2011).

Durante uma infecção primária, a maior parte dos indivíduos apresenta infecção subclínica com febre ligeira a moderada. Em contrapartida, nas infeções secundárias a fisionomia da doença altera-se, contribuindo então para o desenvolvimento das

complicações mais graves provocadas pelo DENV. Assim, nos casos mais severos, a doença pode evoluir para síndrome do choque do dengue, caracterizado por trombocitopenia e aumento da permeabilidade vascular (Guzman *et al.*, 2010; Kalayanarooj *et al.*, 2007).

A evolução para os síndromes mais graves ocorre, sobretudo, no caso de surgir uma infecção secundária por um serótipo heterólogo do vírus. No entanto, a probabilidade de ocorrência de síndromes severos, numa infecção primária, depende do serótipo do DENV (Clyde *et al.*, 2006; Faheem *et al.*, 2011).

A gravidade do síndrome do choque de dengue, principalmente quando ocorre derrame vascular, é condicionada pela idade do paciente, sendo particularmente pertinente em crianças, devido à sua fraca integridade capilar. Nos adultos, as infecções primárias por qualquer um dos quatro serótipos do vírus normalmente são acompanhadas por sintomas febris ligeiros, sobretudo nas infecções pelo serótipo 1 e pelo serótipo 3. Os vários síndromes resultantes do DENV dependem de vários fatores do paciente, entre eles a idade e o estado imunológico. Desta forma, comorbidades como a asma, diabetes mellitus e outras patologias crônicas constituem risco para o doente, podendo o seu estado de saúde ser agravado. Para além destes fatores, o serótipo do vírus e o historial genético do paciente também contribuem para a gravidade da febre hemorrágica e de outras comorbidades do dengue. No entanto, estes fatores isolados não constituem perigo, apenas representando risco quando atuam concomitantemente. (Guzman *et al.*, 2010; Kalayanarooj *et al.*, 2007).

6.1 Resposta imunitária

O organismo reage ao vírus do dengue ativando o sistema antiviral por ação da cascata de sinalização do interferão (Faheem *et al.*, 2011). Algumas proteínas virais contribuem para a evasão dos vírus ao sistema imunitário do hospedeiro. Neste contexto, as glicoproteínas NS2A, NS4A e NS4B, possuem um papel importante, na medida em que bloqueiam o sinal de transdução do interferão (Clyde *et al.*, 2006).

Quando ocorre infecção prévia com um dado serótipo de DENV, esta não confere imunidade no caso de ocorrer uma segunda infecção com um subtipo heterólogo. Isto é, adquire-se imunidade contra um serótipo específico na infecção primária mas apenas é conferida imunidade parcial ou temporária para os outros tipos. Como a imunidade é serótipo-específica, a circulação de mais do que um tipo do vírus numa dada região aumenta o risco de aparecimento de uma infecção secundária (Kalayanarooj *et al.*, 2007;

Moi, Lim, Chua, Takasaki, & Kurane, 2012). A imunidade específica de um dado serótipo deve-se aos anticorpos neutralizantes e às células T de memória, podendo mesmo atuarem concomitantemente. Os anticorpos contra as proteínas prM e E, possuem a capacidade para inibir o vírus, e em conjunto com os anticorpos contra a proteína NS1, conferirem imunidade (Clyde *et al.*, 2006).

A probabilidade de sucederem síndromes mais graves, tais como a febre de dengue hemorrágica e o síndrome do choque de dengue, numa infeção secundária, é maior do que numa infeção primária. Acredita-se que os anticorpos produzidos na infeção primária desempenham um papel essencial neste processo. No decorrer da infeção subsequente, os anticorpos formam complexos infecciosos com o vírus do dengue, e por conseguinte, a descendência viral vai ter os seus níveis aumentados (Kalayanaroj *et al.*, 2007). Assim, quando a concentração de anticorpos neutralizantes heterólogos diminui, a gravidade da infeção secundária aumenta (Guzman *et al.*, 2007).

Como foi analisado nos estudos realizados por Moi *et al.* (2012), os anticorpos possuem duas funções fundamentais na infeção, ou seja, tanto a neutralizam como a amplificam. Os autores verificaram a existência de um fenómeno de amplificação da infeção nas células expressoras do recetor Fc γ , nestas, os níveis do vírus encontram-se bastante elevados. Por outro lado, quando usadas as células recetor Fc γ negativas, comprova-se que os anticorpos possuem atividade neutralizante. Quando os investigadores analisaram as amostras de soro recolhidas, concluíram que estas funções dos anticorpos são competitivas, isto é, a atividade de imunoamplificação da infeção diminui a atividade neutralizante. Este mecanismo de amplificação da infeção é denominado de imunoamplificação dependente de anticorpos (ADE), e tem sido apontado como fator promotor dos síndromes mais graves de dengue.

Os anticorpos contra o DENV reagem cruzadamente com as células endoteliais, com os fatores de coagulação e com as plaquetas, podendo mesmo destruí-las. Os anticorpos anti-proteína NS1 ligam-se às células endoteliais, promovendo a apoptose nestas células. Para além desta função, estes anticorpos induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias (Clyde *et al.*, 2006).

A ativação do sistema de complemento, em associação com a libertação de citocinas inflamatórias, resulta no derrame vascular observado nos casos mais graves da infeção pelo vírus do dengue (Edelman, 2007). O aumento da permeabilidade vascular, resultante da infeção pelo DENV, deve-se à produção de fatores inflamatórios pelas células infetadas, como o TNF- α e o óxido nítrico (NO). Estes fatores, produzidos

essencialmente por macrófagos e monócitos, contribuem para a ativação de células endoteliais. Através da monitorização dos níveis de albumina plasmática podem aferir-se as alterações ao nível da permeabilidade vascular (Clyde *et al.*, 2006).

A síntese de óxido nítrico pelos monócitos dos pacientes infetados, está relacionada com o atraso na fase aguda da doença, levando inclusivé à redução das partículas virais nos monócitos. Apesar de o NO ter mostrado boas perspectivas na diminuição da infecção pelo DENV, a produção em excesso deste elemento pode resultar na deterioração de células endoteliais (Clyde *et al.*, 2006).

Com o intuito de desenvolver possíveis agentes terapêuticos contra o vírus do dengue é essencial uma melhor compreensão dos mecanismos de evasão viral ao sistema imunitário, e todos os processos a ele associados (Yossef, Rosental, Appel, Hershkovitz, & Porgador, 2012).

6.1.1 Fenómeno de imunoamplificação dependente de anticorpos, ADE

Quando as células fagocitárias mononucleares são infetadas através dos seus recetores Fc, por imunocomplexos formados pela ligação entre o vírus do dengue e anticorpos não neutralizantes, dá-se o fenómeno de imunoamplificação, ADE. “Estes anticorpos não neutralizantes, resultam de infeções heterotípicas anteriores ou de baixas concentrações de anticorpos anti dengue, de origem materna.” (Guzman *et al.*, 2010). Como as pessoas podem ser infetadas pelos quatro serótipos do DENV, verifica-se que aquelas que desenvolvem a infecção mais do que uma vez possuem maior probabilidade de contrair manifestações hemorrágicas graves (Rico-Hesse, 2007).

O fenómeno ADE postula que vários anticorpos específicos para o vírus do dengue, tanto anticorpos reativos, resultantes de uma infecção primária, quanto anticorpos específicos para um dado serótipo, interagem com o DENV, sem o inibir. Deste modo, os anticorpos utilizam os recetores Fc dos monócitos ou macrófagos, aumentando a captação do vírus nestas células. Os anticorpos não neutralizantes são, de certa forma, causadores do elevado risco de febre hemorrágica do dengue e síndrome do choque do dengue, nas infeções subsequentes (Clyde *et al.*, 2006). Acredita-se portanto, que estes anticorpos reativos favorecem a entrada do vírus nas células, aumentando a intensidade da infecção (Edelman, 2007).

Como explicitado nos parágrafos anteriores, a imunoamplificação da infecção resulta dos anticorpos formados aquando da infecção primária, que não neutralizam vírus cujo serótipo indutor é diferente. Porém, para além disto, o mecanismo ADE também

pode derivar da libertação exacerbada de citocinas pelas células apresentadoras de antígenos (células dendríticas, células de Langerhans, macrófagos e linfócitos B), células endoteliais e linfócitos T (Rico-Hesse, 2007).

6.1.2 Importância das citocinas na imunopatogénese

A resposta imunitária ao vírus do dengue envolve os anticorpos resultantes de uma infeção prévia, a resposta das células B e células T, e a ação das citocinas nas células. As citocinas são importantes para a imunopatogénese do vírus, principalmente, dado o seu carácter inflamatório nas células endoteliais vasculares. A citocina que mais contribui para a severidade do dengue é o fator tumoral de necrose alfa, TNF- α . Esta citocina ativa macrófagos localmente, contudo, quando é libertada na corrente sistémica, contribui para a elevada permeabilidade vascular registada nos casos de febre hemorrágica do dengue e de síndrome de choque do dengue. Para além da TNF- α , existem outras citocinas envolvidas nos síndromes mais graves de dengue, são elas, IL-6, IL-8 e IL-10. A interleucina 10 é caracterizada pelas suas várias propriedades anti-inflamatórias, estando inserida na regulação de respostas inflamatórias (Clyde *et al.*, 2006).

6.1.3 Papel do Interferão na resposta imunitária

Os recetores STAT1 fazem parte da resposta mediada pelo interferão, que é produzido maioritariamente pelas células NK, *natural killers*. Numa situação de febre do dengue de carácter moderado, a síntese e atividade destas células está aumentada. Contrariamente, uma quantidade reduzida de células NK e a diminuição da sua atividade, são fatores que estão relacionados com o agravamento da doença. Os pacientes com febre do dengue e febre hemorrágica do dengue possuem níveis elevados de IFN α e IFN γ , enquanto que pacientes com síndromes mais severos como o síndrome do choque do dengue apresentam níveis reduzidos de IFN γ . Assim, os níveis elevados de IFN fazem parte de uma resposta efetiva do hospedeiro, e, por outro lado, os níveis reduzidos demonstram que a resposta foi ineficaz (Clyde *et al.*, 2006).

O IFN γ , produzido essencialmente pelas células NK e células T CD8+, ativa os macrófagos e as células T CD4+. Os macrófagos, ativados pelo interferão γ , desempenham um papel central na eliminação do vírus do dengue, particularmente, por meio da produção de óxido nítrico, o qual está implicado no bloqueio da replicação viral

(Clyde *et al.*, 2006). A figura 9 apresenta sucintamente o processo de patogênese viral, representando os fatores e células envolvidos na resposta imunitária.

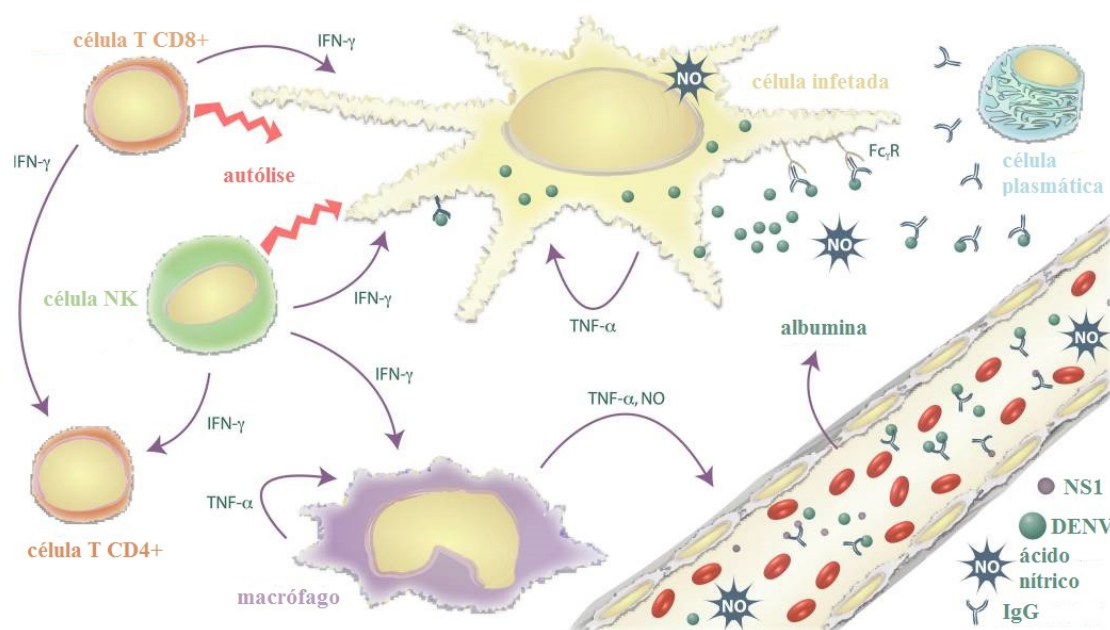


Figura 9. Patogênese da infecção pelo vírus do dengue. O DENV infecta a célula alvo via endocitose mediada por recetor ou através de complexos formados com os anticorpos. Os macrófagos, monócitos ou células dendríticas infectados produzem fatores inflamatórios, tais como NO e TNF, que contribuem para o extravasamento vascular. (Adaptado de: Clyde *et al.*, 2006).

6.2 Resposta alérgica

Em resultado às picadas dos mosquitos, podem surgir reações cutâneas cuja intensidade varia conforme a resposta alérgica do doente. Estes sintomas, resultam da reação da pele do hospedeiro à introdução da saliva do mosquito, aquando a ingestão de sangue. A saliva do artrópode hematófago, é constituída por proteínas que são importantes para o processo digestivo do mosquito, designadamente, vasodilatadores, inibidores da cascata da coagulação e inibidores da agregação plaquetária. Para além disso, a saliva do mosquito atua ainda na transmissão do vírus. Com a introdução dos antígenos do inseto, inicia-se a produção de anticorpos IgG e IgE. Os pacientes alérgicos ao mosquito possuem anticorpos contra os constituintes da saliva (Carvalho, Rocha, & Almeida, 2011).

6.3 Suscetibilidade ou resistência ao vírus do dengue

Estudos epidemiológicos revelaram que a influência de certos fatores do hospedeiro contribui para a suscetibilidade e gravidade da infecção provocada pelo vírus do dengue (Coffey *et al.*, 2009; Kalayanarooj *et al.*, 2007; Simmons *et al.*, 2012).

As células NK, os macrófagos, os mastócitos, as células dendríticas, as células B e o sistema complemento são moléculas que fazem parte da imunidade inata do hospedeiro, desempenhando um papel crucial na eliminação de agentes infecciosos. A suscetibilidade ou resistência ao vírus do dengue e às doenças infecciosas em geral está relacionada com a predisposição genética, contribuindo para isso fatores do sistema imunitário inato (Kalayanarooj *et al.*, 2007). Os alelos da classe I dos antígenos leucocitários humanos (HLA), o gene recetor do DC-SIGN, um polimorfismo no gene do fator de necrose tumoral (TNF) e o complexo de histocompatibilidade major são alguns exemplos de fatores do paciente que acrescem a severidade de uma infecção secundária (Coffey *et al.*, 2009; Kalayanarooj *et al.*, 2007).

Segundo experiências realizadas por Kalayanarooj *et al.* (2007), o sistema sanguíneo ABO também contribui para a sensibilidade ao DENV. Os indivíduos que não possuam um antígeno do sistema sanguíneo ABO apresentam anticorpos com aptidão para aglutinar células que transportem esse antígeno. Os investigadores demonstraram, que numa infecção secundária, os indivíduos pertencentes ao grupo sanguíneo AB possuem maior predisposição para sofrer os casos mais graves de dengue, verificando-se, principalmente, com os serótipos 2, 3 e 4. Por outro lado, esta relação entre grupo sanguíneo e severidade do dengue não foi observada nos estudos realizados com os outros grupos sanguíneos, O, A e B.

Para além dos aspetos descritos anteriormente, a idade reduzida, o sexo feminino, o excesso de peso e o serótipo do DENV, contribuem para a gravidade da infecção (Simmons *et al.*, 2012).

O serótipo influencia a gravidade da infecção, na medida em que, por exemplo, o genótipo do DENV-2, originário do sudeste asiático, o genótipo indiano do DENV-3 e os genótipos provenientes da América são mais virulentos, contribuindo para a formação de surtos de FHD e de SCD. Por outro lado, o serótipo existente no Peru, atua de forma oposta, ou seja, raramente são desenvolvidos os síndromes mais graves da doença, mesmo em situações de infecção secundária (Rico-Hesse, 2007).

Capítulo 7 – Diagnóstico

7.1. Diagnóstico diferencial

Como a infeção pelo vírus do dengue possui um amplo espectro de sintomas e manifestações clínicas, um indivíduo infetado tanto pode manifestar sintomas febris moderados quanto evoluir para estádios mais graves, ou mesmo morte. Assim, a realização de um diagnóstico diferencial é um desafio que implica a análise de vários fatores, que variam segundo a evolução da doença (Simmons *et al.*, 2012). Sempre que um indivíduo viaje para áreas endémicas ou esteja em contacto com o vetor, deve ser considerada a realização de um diagnóstico diferencial (Rico-Hesse, 2007). Neste contexto, a experiência dos profissionais clínicos e o seu entendimento acerca dos sinais, sintomas e métodos de diagnóstico é essencial, principalmente nas áreas onde o risco de infeção é maior (Adalja *et al.*, 2012).

As apresentações e sintomas não específicos e a frequente circulação de mais do que um vírus numa região são parâmetros que, por vezes, dificultam a realização de um diagnóstico preciso. Deste modo, é essencial realizar-se um diagnóstico diferencial considerando outras doenças e vírus com características e manifestações clínicas semelhantes (Gibbons & Vaughn, 2002). Na tabela 4 estão representadas as doenças e microorganismos mais relevantes a ter em consideração na realização de um diagnóstico diferencial.

Tabela 4. Doenças e microorganismos a ter em conta na realização de um diagnóstico diferencial de uma infeção pelo vírus do dengue. Estes patógenos possuem características clínicas similares ao DENV. (Adaptado a partir de: Gibbons & Vaughn, 2002; Simmons *et al.*, 2012).

Diagnóstico diferencial de dengue
Arboviroses provocadas por: Chikungunya virus (este vírus é geralmente confundido com dengue, sobretudo nos países do Sudeste Asiático), vírus da encefalite japonesa, vírus West Nile, vírus da encefalite de St.Louis
Outras doenças de origem viral: síndrome pulmonar por hantavírus (<i>Bunyaviridae</i>), sarampo, rubéola, gripe, hepatite A.
Doenças bacterianas: sepsis, infeções provocadas por Meningococcus, escarlatina, febre tifóide
Doenças parasitárias: Leptospirose, malária, doenças provocadas pela Rickettsia.

7.2. Diagnóstico laboratorial

A realização de um diagnóstico antecipado é fundamental para o controlo do dengue, principalmente, para o domínio dos surtos e prevenção da evolução da doença

(Wings *et al.*, 2008). A identificação precoce da infecção permite que a atuação clínica seja bem sucedida (Adalja *et al.*, 2012). Nos casos epidêmicos, os testes laboratoriais são fundamentais para o diagnóstico preliminar e detecção dos primeiros casos de uma infecção pelo vírus do dengue. Consegue-se aferir o responsável pelos surtos, identificar o serótipo específico e descobrir a sua origem, contribuindo, deste modo, para a implementação de estratégias de controlo do agente etiológico (Alves *et al.*, 2013).

Por vezes, não é possível realizar o diagnóstico no momento da infecção, deste modo, realiza-se um diagnóstico prévio analisando vários fatores relevantes, particularmente, o histórico das viagens realizadas e as manifestações clínicas apresentadas. Como o período de incubação do vírus é menor do que duas semanas, examinando o histórico de viagens de um paciente, pode descartar-se a hipótese de ocorrência de outras doenças graves (Bäck & Lundkvist, 2013).

O diagnóstico definitivo é constituído através de vários métodos laboratoriais que incluem, a detecção direta dos elementos do vírus e a detecção indireta através de métodos serológicos. A sensibilidade de cada método de diagnóstico depende da duração da infecção e do período em que é realizado (Bäck & Lundkvist, 2013; Simmons *et al.*, 2012). A figura 10 representa a comparação entre os métodos de detecção diretos e indiretos relativamente à sua acessibilidade e especificidade.

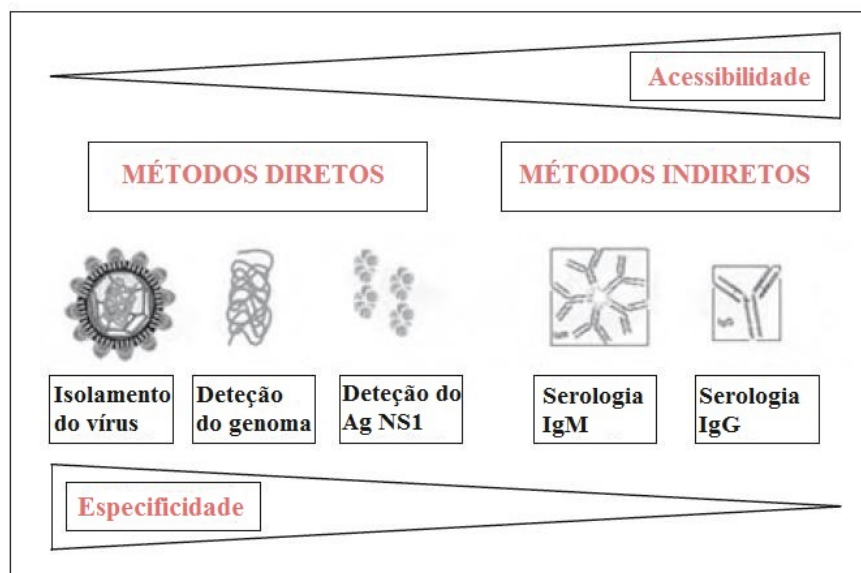


Figura 10. Comparação entre os métodos de diagnóstico de uma infecção por dengue de acordo com a sua acessibilidade e especificidade. (Adaptado de: World Health Organization, 2009).

Na realização de um diagnóstico são utilizados diversos marcadores virológicos tais como, RNA viral, antígenos virais e anticorpos específicos contra o vírus do dengue. A cultura do vírus, os testes de amplificação do material genético e os ensaios serológicos são as técnicas de detecção, mais utilizadas atualmente (Bäck & Lundkvist, 2013).

Na fase febril, a detecção do genoma viral através de ensaios de amplificação com a transcriptase reversa, RT-PCR, ou a detecção da proteína viral NS1 pelo método imunoenzimático ELISA, são dados que satisfazem a caracterização de um diagnóstico confirmatório (Simmons *et al.*, 2012). A tabela 5 apresenta os parâmetros laboratoriais que estabelecem se uma infecção por DENV é provável ou definitiva.

Tabela 5. Critérios laboratoriais para infecções confirmadas e infecções prováveis. (Adaptado de: Guzman *et al.*, 2010).

Diagnóstico laboratorial de uma infecção pelo vírus do dengue	
Infeção confirmada	Infeção provável
Isolamento do vírus	IgM positiva
Deteção do genoma viral	Concentração de IgG elevada ($\geq 1,280$), por confirmação com o teste de inibição da hemaglutinação
Deteção de antígenos	
Seroconversão de IgM ou IgG	

7.2.1. Isolamento do vírus

Dentro dos métodos de diagnóstico do dengue, a cultura de vírus fornece o resultado mais preciso e específico, no entanto, este processo possui algumas desvantagens (Guzman *et al.*, 2010). De modo a obter um isolamento aceitável, as amostras de soro necessitam de conter as quantidades suficientes para detecção do vírus do dengue. Para além disto, este método apresenta outras limitações, principalmente em áreas pobres e rurais, onde nem sempre é passível de ser realizada, por falta das condições e instalações requeridas (Bäck & Lundkvist, 2013; Guzman *et al.*, 2010).

Esta técnica é trabalhosa e demorada dado que a replicação do vírus só é obtida após seis a dez dias (Wang & Sekaran, 2010). É também dispendiosa, requerendo profissionais especializados e instalações específicas, nomeadamente laboratórios de tipo 3 (Bäck & Lundkvist, 2013; World Health Organization, 2009).

As amostras de soro recolhidas de pacientes no estágio de virémia, ou seja, nos primeiros três a cinco dias de febre, são colheitas propícias ao isolamento do DENV. As amostras biológicas mais convenientes para a cultura do vírus incluem, soro, plasma e centrifugado sanguíneo dos pacientes durante a fase aguda, inoculação em mosquitos e, nos casos fatais, recorre-se à colheita de tecidos do fígado, nódulos linfáticos, baço e timo, provenientes de cadáveres (Guzman *et al.*, 2010; Peeling *et al.*, 2010).

De maneira a isolar o vírus de uma amostra infetada utilizam-se várias linhas celulares. A linha celular C6/36, proveniente do mosquito *Aedes albopictus*, tem sido a cultura preferencialmente utilizada nos últimos anos, contudo, existem outras linhas celulares passíveis de investigação. Podem ser usadas as células do mosquito *Aedes pseudocustellaris*, designadas de AP61, e também as células de mamíferos, nomeadamente as células Vero, células LLC-MK2 e as células BHK21 (Bäck & Lundkvist, 2013; Guzman *et al.*, 2010; Peeling *et al.*, 2010).

Após a inoculação viral, a serotipagem pode ser determinada através de ensaios de imunofluorescência que utilizem anticorpos monoclonais serótipo-específicos (Peeling *et al.*, 2010).

Apesar das desvantagens, a cultura de vírus constitui o teste padrão na identificação do dengue (Wings *et al.*, 2008).

7.2.2. Ensaio serológicos

Os ensaios serológicos são baseados na identificação de anticorpos específicos contra o vírus do dengue (Bäck & Lundkvist, 2013). A imunidade adquirida contra o DENV depende da produção das imunoglobulinas IgM e IgG que são maioritariamente específicas para a proteína E. A intensidade desta resposta imunitária depende do tipo de infeção, ou seja, se o paciente possui uma infeção primária ou secundária (Peeling *et al.*, 2010).

Quando ocorre uma infeção secundária é gerada uma resposta imunitária em que são produzidas grandes quantidades de imunoglobulinas G e M, as primeiras estimuladas pelas células de memória B da infeção primária, e as segundas resultantes da infeção secundária atual. As IgM são as primeiras imunoglobulinas a aparecer numa infeção, aumentando drasticamente nas primeiras duas semanas, porém, com o passar do tempo, a sua concentração vai diminuindo (Guzman *et al.*, 2010). Isto deve-se ao facto de numa infeção primária a resposta dos anticorpos IgM ser mais acentuada e específica do que em infeções secundárias (Hunsperger *et al.*, 2009). Assim, numa

infecção secundária, os níveis de IgM são bastante reduzidos. Em oposição, os níveis de IgG são baixos na primeira semana de infecção, aumentando exponencialmente a partir da segunda semana (Guzman *et al.*, 2010). Os anticorpos IgG podem durar vários anos em circulação, ao contrário dos IgM que persistem aproximadamente durante dois meses (Bäck & Lundkvist, 2013).

Para a deteção das imunoglobulinas podem realizar-se vários ensaios, o MAC-ELISA, o IgG-ELISA, o ensaio de rácio de IgM-IgG e os ensaios de neutralização são alguns exemplos (Guzman *et al.*, 2010).

Comparativamente a outros métodos, os ensaios serológicos constituem técnicas de diagnóstico de uma infecção pelo DENV pouco dispendiosas e de fácil reprodução. Como são relativamente fáceis de ser reproduzidos, existem *kits* de diagnóstico disponíveis comercialmente (Bäck & Lundkvist, 2013; Guzman *et al.*, 2010).

7.2.2.1 Ensaio MAC-ELISA

O ensaio MAC-ELISA é uma técnica imunoenzimática de deteção de anticorpos IgM específicos. É muito utilizada e vantajosa em regiões onde circulam outros vírus semelhantes ao vírus do dengue, como por exemplo, o vírus da encefalite japonesa.

O MAC-ELISA emprega-se com o intuito de identificar a presença de IgM em colheitas de sangue e saliva, não sendo possível a sua identificação em amostras da urina. Apesar da sua elevada especificidade e sensibilidade, apresenta, contudo, algumas limitações, nomeadamente a presença de falsos positivos. Estes resultados são consequência de doenças infecciosas como a malária e a leptospirose que são endémicas em algumas regiões, co-circulando com o DENV, assim como também resultam da reatividade cruzada com outros vírus da família *Flaviviridae*. Esta reatividade dos anticorpos deriva da vacinação, por exemplo, contra o vírus da febre amarela, também ele um flavivírus (Bäck & Lundkvist, 2013; Guzman *et al.*, 2010). Para além destas desvantagens, que podem comprometer a análise dos resultados, este método só permite a deteção de IgM aproximadamente cinco dias após o aparecimento dos primeiros sintomas (Wings *et al.*, 2008).

Numa análise global, as principais limitações destes testes são a incapacidade de identificação do serótipo do DENV e a potencial reação cruzada em presença de outros vírus. Em países endémicos, estes testes não devem ser utilizados para confirmação de uma doença atual, pois como os anticorpos IgM podem persistir por aproximadamente sessenta dias, tal facto indica que a infecção ocorreu nos 2-3 meses antecedentes. Deste

modo, não se consegue aferir com exata precisão quando ocorreu a doença (Guzman *et al.*, 2010).

Os testes de IgM podem ser úteis na determinação de um diagnóstico de dengue em concomitância com a análise das manifestações clínicas, história clínica e outros dados epidemiológicos (Hunsperger *et al.*, 2009).

7.2.2.2 Ensaio IgG-ELISA

Este método de diagnóstico tem como objetivo detetar anticorpos IgG específicos para o vírus do dengue. De modo a quantificar os IgG específicos, este ensaio pode utilizar tanto diluições de soro quanto usar a proporção de IgM para IgG. Os antígenos do DENV, empregues na realização do teste, podem ser os mesmos do ensaio MAC-ELISA. Apesar de na presença de outros flavivírus este teste perder especificidade, as reações cruzadas são pouco frequentes. O MAC-ELISA pode até ser um ensaio útil na distribuição e discriminação das doenças que apresentam similaridades com o dengue devido à especificidade dos anticorpos IgG. Como aplicações principais, o ensaio IgG-ELISA pode ser utilizado para diferenciar e classificar as infeções primárias e secundárias assim como identificar epidemiologicamente uma infeção pelo DENV que ocorreu no passado (Guzman *et al.*, 2010). Os critérios que definem uma infeção primária são, um valor de IgM positivo e um valor de IgG negativo, no caso de amostras recolhidas antes do oitavo dia da infeção. Por outro lado, uma infeção secundária caracteriza-se por concentrações elevadas de IgG, nomeadamente, um valor superior a 1,280, por inibição da hemaglutinação no soro (Peeling *et al.*, 2010).

O ensaio que relaciona a proporção entre o IgM e o IgG constitui outra forma de diagnóstico, sobretudo para diferenciar as infeções primárias das infeções secundárias. No entanto, as taxas de IgM e IgG variam conforme as manifestações clínicas do indivíduo (Guzman *et al.*, 2010).

7.2.2.3 Ensaios de neutralização

Com o intuito de diagnosticar uma infeção pelo vírus do dengue, podem ser utilizados métodos serológicos de neutralização. Os testes de neutralização por redução em placas (PRNT) e os ensaios de micro neutralização são os principais ensaios de neutralização, sendo empregues de forma a demonstrar os serótipos virais, resultantes de uma infeção primária (Guzman *et al.*, 2010).

A técnica PRNT pode ser aplicada no desenvolvimento de vacinas. Com a descoberta iminente de uma vacina eficaz é muito importante recorrer a ensaios de diagnóstico efetivos que comprovem a qualidade e as características protetoras das vacinas (Rainwater-Lovett, Rodriguez-Barraquer, Cummings, & Lessler, 2012).

7.2.3 Métodos de amplificação dos ácidos nucleicos

As técnicas de cultura de células e ensaios serológicos analisam as colheitas de material biológico recolhidas de pacientes com pelo menos sete dias de sintomas. Estes testes não podem, portanto, ser realizados nos estádios iniciais da doença. Para além desta limitação, podem ainda fornecer resultados falsos positivos devido à reatividade cruzada dos anticorpos anti-DENV, na presença de outros flavivírus. Deste modo, os métodos de amplificação de ácidos nucleicos constituem boas alternativas às técnicas anteriores (Wings *et al.*, 2008).

Os testes de amplificação de ácidos nucleicos permitem detetar o genoma viral a partir de tecidos, de soro, ou do sangue total de indivíduos, na fase inicial da infeção (Peeling *et al.*, 2010). A técnica de RT-PCR, por exemplo, pode ser realizada na fase aguda da doença, que coincide com o início da virémia, fornecendo um resultado específico do genoma RNA do vírus do dengue (Wings *et al.*, 2008).

O diagnóstico através de técnicas de amplificação, é rápido, específico e preciso, contudo, só é passível de realização na fase aguda da doença, é dispendioso e requer a sua realização por profissionais especializados (Bäck & Lundkvist, 2013).

7.2.3.1 Ensaio PCR utilizando transcriptase reversa, RT-PCR

Este método envolve vários processos de amplificação, que utilizam os *primers* para a região pretendida do genoma do DENV, de modo a localizar essa região específica no genoma viral. Destas reações de amplificação resultam vários produtos que são divididos conforme o tamanho, através de eletroforese em gel de agarose, e assim, obtêm-se os serótipos de dengue diferenciados (Guzman *et al.*, 2010). Como o produto amplificado inicialmente é depois utilizado como alvo para uma nova etapa de amplificação, este método permite uma elevada sensibilidade (Peeling *et al.*, 2010).

Apesar da eficácia e da sensibilidade, esta técnica é, no entanto, trabalhosa e pode ser comprometida por contaminações (Wings *et al.*, 2008).

7.2.3.2 Ensaio PCR em tempo real, RT-PCR

Esta técnica, totalmente automatizada, permite o diagnóstico do vírus do dengue em pouco tempo, fazendo com que seja um método de rotina bastante conveniente. Relativamente a outras técnicas tradicionais, o PCR em tempo real, apresenta maior rapidez e precisão, reduz significativamente o risco de contaminação e resultados falsos positivos, e permite a detecção quantitativa do vírus. A quantificação e a discriminação dos vários serótipos do vírus é revelada em aproximadamente duas horas. Este processo baseia-se na utilização de sondas fluorescentes que permitem a detecção dos produtos amplificados (Guzman *et al.*, 2010).

Os *primers* empregues podem provir da extremidade 5' do genoma viral, da extremidade 3' ou da glicoproteína não estrutural NS5 (Wings *et al.*, 2008). Ao contrário dos métodos tradicionais, esta técnica não necessita da realização de eletroforese (Guzman *et al.*, 2010). Para além da detecção do genoma viral nas amostras dos pacientes, este ensaio pode quantificar o RNA viral nos tecidos do vetor, contribuindo assim para o estudo do ciclo do mosquito, particularmente ao nível da dinâmica de transmissão dos vários genótipos do vírus (Rico-Hesse, 2007).

Existem dois tipos de RT-PCR, os “*singleplex*” e os “*multiplex*”. Os primeiros detetam um único serótipo numa reação de amplificação, enquanto que os “*multiplex*” detetam os quatro serótipos do vírus do dengue. Apesar dos ensaios “*multiplex*” apresentarem os resultados com maior rapidez, são menos sensíveis do que os “*singleplex*” (Guzman *et al.*, 2010; World Health Organization, 2009).

O facto de este teste poder ser utilizado nos estádios preliminares da doença, constitui uma grande vantagem, na medida a controlar a progressão da doença (Guzman *et al.*, 2010).

7.2.4 Ensaios utilizando a detecção de antígenos

Em resultado das desvantagens dos métodos serológicos para diagnosticar infeções agudas, foram desenvolvidos métodos alternativos que se baseiam na detecção da glicoproteína viral NS1 (Hunsperger *et al.*, 2009). Todavia, apesar das vantagens, na fase aguda de infeções secundárias, estes métodos podem ter a sua ação comprometida devido à existência de imunocomplexos entre o vírus e os anticorpos IgG (Peeling *et al.*, 2010).

Os antígenos do vírus do dengue podem ser identificados através de amostras de tecidos vivos ou mortos. Os tecidos são maioritariamente provenientes do fígado, baço,

nódulos linfáticos e timo. Este método utiliza anticorpos, enzimas e substratos colorimétricos que permitem a detecção de antígenos específicos (Guzman *et al.*, 2010).

7.2.4.1 Detecção de antígenos (glicoproteína NS1)

A NS1 é uma proteína não estrutural, específica de todos os flavivírus, que circula na corrente sanguínea e estimula a resposta imunitária humoral, constituindo assim uma via de diagnóstico de infecções pelo vírus do dengue. Esta glicoproteína é importante para o processo de replicação viral (Guzman *et al.*, 2010).

Para detetar antígenos recorre-se a ensaios imunoenzimáticos ELISA, à técnica de fluxo lateral e a métodos de detecção das respostas dos anticorpos IgG e IgM à proteína NS1. Nos dias de hoje, já estão disponíveis comercialmente *kits* de detecção de antígenos da glicoproteína NS1 (Guzman *et al.*, 2010). Estes *kits* são muito sensíveis e bastante úteis no diagnóstico confirmatório do dengue na fase aguda, principalmente em pacientes que exibam uma infecção primária, o que é comum nos viajantes. Neste período inicial, a sensibilidade do método pode ultrapassar os 90% dado que a atividade antigénica pode perdurar por vários dias após a recuperação do estado febril. Por outro lado, no caso de infecções secundárias, a sensibilidade reduz para os 60-80%, o que revela a ação da resposta imunitária face a uma infecção prévia (Simmons *et al.*, 2012; Wings *et al.*, 2008).

7.2.4.2 Imunohistoquímica

Os antígenos virais podem ser identificados em porções de tecidos congelados ou lâminas de parafina, recolhidos de cadáveres. Estes métodos recorrem à utilização de anticorpos monoclonais que são visualizados através de marcadores específicos, tais como, corantes fluorescentes, enzimas, ou ouro coloidal (Peeling *et al.*, 2010).

7.2.5 Testes rápidos de detecção de antígenos e anticorpos

Atualmente, existem diversos métodos laboratoriais que permitem o diagnóstico de uma infecção provocada pelo vírus do dengue. Apesar de bastante sensíveis, a maioria destes testes exige, porém, certas condições, tais como, instalações dispendiosas, equipamento laboratorial apropriado e profissionais especializados. Para além disto, os métodos convencionais podem ser demorados. De maneira a contornar estas limitações, foram criados *kits* que permitem o rápido diagnóstico, sendo mais

convenientes nos casos em que é necessária a atuação urgente, ou quando as instalações especializadas não são possíveis (Andries *et al.*, 2012).

O teste mais utilizado para a deteção rápida de anticorpos e antígenos é o *Standard Diagnostic Bioline Dengue Duo kit*. Este teste é constituído por dois ensaios, o primeiro com o propósito de detetar o antígeno viral NS1 e o segundo permite a deteção de anticorpos IgM/IgG anti-DENV, em amostras de soro, plasma ou de sangue total (Andries *et al.*, 2012; Standard Diagnostics, 2007). Este ensaio veio possibilitar a realização de um diagnóstico logo a partir do primeiro dia da infeção, contribuindo para tal, tanto o antígeno NS1, quanto o anticorpo IgM, fatores cruciais no diagnóstico precoce de uma infeção pelo vírus do dengue (Wang & Sekaran, 2010).

O *SD Bioline Dengue NS1 Ag* apresenta, contudo, algumas limitações que comprometem a sua sensibilidade, como a ocorrência ocasional de reações cruzadas com outros flavivírus, alfavírus e parasitas da família *Plasmodium spp.*, em particular, nas regiões onde persistem concomitantemente com o DENV. De maneira a evitar estas desvantagens, devem realizar-se, sempre que possível, os dois ensaios em conjunto, o que conduz a um aumento exponencial da sensibilidade e especificidade do *kit*. Assim, pode obter-se um diagnóstico preciso, de forma rápida e sensível, permitindo a atuação clínica mais apropriada, e evitando o uso desnecessário de antibióticos e outros fármacos (Andries *et al.*, 2012; Wang & Sekaran, 2010).

7.2.5.1 Testes rápidos de deteção de antígenos da glicoproteína NS1

Estes testes constituem uma primeira abordagem no diagnóstico detetando uma infeção por DENV antes da realização da seroconversão, dado que os anticorpos IgG e IgM só são detetáveis a partir do quarto dia da doença. Assim, através da deteção do antígeno NS1, o *SD Bioline*, permite o diagnóstico numa fase precoce. Na fase inicial da infeção, este antígeno pode ser encontrado em grandes concentrações no soro de indivíduos infetados, podendo, assim, ser utilizado como marcador da infeção aguda. Este ensaio é muito conveniente pois permite a deteção do antígeno NS1 logo a partir do primeiro dia, posteriormente ao início dos sintomas febris, e até ao nono dia. O resultado é dado em apenas 15 a 20 minutos, o que constitui uma grande vantagem. A colheita pode ser realizada a partir de amostras de plasma, soro, ou do sangue total. Como os anticorpos IgG e IgM só se podem detetar ao terceiro ou quarto dia da infeção, este pode ser um teste de diagnóstico bastante útil (Standard Diagnostics, 2007).

A proteína NS1 é libertada no sangue e pode ser detetada utilizando ensaios imunoenzimáticos ou imunocromatográficos, a partir do primeiro dia em que surgiram os sintomas febris, e até 14 dias após o culminar da infeção. A NS1 permite um diagnóstico rápido inicial, mesmo quando as condições não são favoráveis e os laboratórios possuem equipamentos e recursos humanos escassos (Andries *et al.*, 2012).

Um resultado positivo no teste *SD Bioline*, de deteção da NS1, pode fornecer um diagnóstico confirmatório, o que não sucede no teste de IgG e IgM, em que os anticorpos podem permanecer detetáveis durante bastante tempo, por vezes meses (Standard Diagnostics, 2007).

7.2.5.2 Testes rápidos de deteção de Anticorpos (IgM e IgG)

Atualmente, já existem disponíveis no mercado testes de deteção de imunoglobulinas, com atividade e sensibilidade satisfatórias, contribuindo para a rápida deteção de uma infeção pelo DENV (Hunsperger *et al.*, 2009; Simmons *et al.*, 2012). Apesar dos testes serológicos tradicionais apresentarem uma maior sensibilidade do que os *kits* comerciais, estes testes, contudo, são muito vantajosos quando se pretende rapidez na obtenção dos resultados (Peeling *et al.*, 2010).

O ensaio *SD Bioline Dengue IgG/IgM* é um teste imunocromatográfico que permite a deteção diferenciada e qualitativa das imunoglobulinas IgG e IgM, em amostras recolhidas do soro, plasma, ou sangue total. Este teste rápido, diferencia uma infeção primária e secundária, contribuindo deste modo, para a avaliação da gravidade da infeção. Utilizando pequenas quantidades de amostra, o *SD Bioline* consegue aferir o título de anticorpos presentes, possuindo uma sensibilidade e especificidade superiores a 90%. Se o resultado for positivo para a IgM, tal significa que se trata de uma infeção primária, no entanto, se o resultado for positivo para a IgG, significa que é uma infeção secundária ou uma infeção passada. Adicionalmente, se ambas as imunoglobulinas forem positivas, a infeção pelo DENV ocorreu no passado, ou então, trata-se de uma infeção tardia (Standard Diagnostics, 2007).

Os resultados positivos nos testes de IgM e IgG sugerem a presença de uma infeção por DENV, mas por outro lado, um resultado negativo não descarta a possibilidade de infeção (Andries *et al.*, 2012).

A tabela 6 apresenta resumidamente as vantagens e desvantagens dos métodos laboratoriais utilizados para o diagnóstico de uma infeção pelo vírus do dengue.

Tabela 6. Vantagens e desvantagens dos vários métodos de diagnóstico de uma infeção por DENV. (Adaptado de: Peeling *et al.*, 2010).

Método de diagnóstico	Vantagens	Desvantagens
Isolamento e identificação do vírus	Confirmação da infeção; específico; serotipagem	Amostra recolhida na fase aguda; Profissional especializado e instalações apropriadas; Não diferencia entre infeção primária e secundária; Demorado (> 1 semana); Dispendioso
Deteção de RNA	Confirmação da infeção; sensível e específico; serotipagem e genotipagem; resultados em 24-48 h	Falsos positivos resultantes de contaminação; amostra recolhida na fase aguda; profissional especializado e equipamento de laboratório dispendioso; não diferencia entre infeção primária e secundária
Deteção de antígenos		
Ensaio de deteção de NS1	Confirmação da infeção; fácil elaboração; menos dispendioso do os dois métodos anteriores	Menos sensível do que os dois métodos anteriores
Imunohistoquímica	Confirmação da infeção	Menos sensível do que o isolamento viral ou a deteção de RNA; profissional especializado em Patologia
Ensaio serológicos		
Serologia de IgM ou IgG	Confirmação da infeção; fácil elaboração; pouco dispendioso	Em infeções secundárias a concentração de IgM pode ser baixa; a confirmação necessita de duas ou mais amostras serológicas; pode diferenciar entre infeção primária e secundária
Deteção de IgM (amostra simples)	Identifica casos prováveis; útil para vigilância, controlo e monitorização dos surtos	Em infeções secundárias a concentração de IgM pode ser baixa

Capítulo 8 - Medidas de prevenção e controlo

O controlo e a erradicação de mosquitos de um ambiente urbano é uma árdua tarefa que exige elevados recursos e requer uma educação populacional mensurável. A sustentabilidade das medidas está diretamente relacionada com o comportamento dos habitantes nas áreas endémicas (Jansen & Beebe, 2010). A entre ajuda e a cooperação entre as entidades governamentais responsáveis e a comunidade, conduz a uma maior eficácia e rapidez de resolução, contribuindo assim para a sustentabilidade dos programas de controlo e prevenção da infeção pelo DENV. A aceitação das medidas por parte das populações, aliadas ao seu interesse e à sua participação ativa, principalmente na destruição dos focos reprodutivos do mosquito e na implementação de medidas de prevenção pessoais, leva à redução exponencial das espécies, que, consequentemente, contribui para a diminuição da propagação do vírus (Wai *et al.*, 2012).

A abundância e expansão dos vetores do vírus do dengue são influenciados por vários fatores socioeconómicos. Por conseguinte, em países onde os governos são economicamente estáveis e o sistema de saúde é eficiente, as medidas de controlo do mosquito são mais eficazes. A construção de infraestruturas que forneçam água corrente, evitando, assim, o armazenamento de água que propicia ao desenvolvimento dos ovos e larvas, a educação da comunidade e a implementação de programas efetivos de eliminação dos mosquitos, constituem medidas significativas que devem ser adotadas em caso de surtos. A instalação de sistemas de ar condicionado e a introdução de telas nas janelas são estratégias de barreira que podem ser úteis na redução da exposição aos artrópodes (Hopp & Foley, 2001; Jansen & Beebe, 2010).

As estratégias utilizadas hoje em dia, não diferem muito daquelas empregues há 50 anos. O objetivo principal passa pela redução do local de origem das larvas, utilizando-se larvicidas e inseticidas mais sofisticados do que os outrora utilizados (Jansen & Beebe, 2010). A exterminação dos locais de reprodução dos vetores, a aplicação de larvicidas ecológicos e a educação da comunidade são as medidas mais economicamente sustentáveis (Bilal, Hassan, & Khan, 2012).

De uma maneira generalista, os programas de prevenção da infeção pelo vírus do dengue compreendem cinco propósitos fundamentais, são eles, o controlo do vetor, a vigilância eficaz da doença, a preparação dos serviços de saúde, a competência e prática do pessoal envolvido e a pesquisa de novos métodos de controlo do vetor (Guzman *et al.*, 2010).

8.1 Métodos químicos

Estas técnicas de controlo do vetor compreendem a utilização de produtos químicos com atuação em várias fases do ciclo de vida do mosquito, desempenhando a sua ação na fase larval ou na fase adulta. Estes produtos podem ser acrescentados nas águas armazenadas perto das residências ou mesmo na água de consumo humano, visto que, a água é o local de eleição para a reprodução dos artrópodes (Guzman *et al.*, 2010; Jansen & Beebe, 2010; Santacoloma, Chaves, & Brochero, 2012).

Desde 1970, que têm sido utilizados vários agentes químicos nas águas, particularmente, o larvicida organofosforado temefos, contudo, devido ao aumento da resistência a este agente, a sua eficácia tem vindo a ser comprometida (Chen *et al.*, 2013; Guzman *et al.*, 2010). A exposição prolongada ao temefos leva a reações de resistência fisiológica, que está relacionada com o mecanismo enzimático dos vetores. O aumento de enzimas esterases inespecíficas nos mosquitos, nomeadamente no *Aedes aegypti*, constitui o mecanismo bioquímico responsável pela resistência aos agentes organofosforados (Santacoloma *et al.*, 2012).

Para além do temefos, existem outros agentes químicos de particular interesse. O malatião, o fenitrotião e o propaxur, são inseticidas que atuam na fase adulta do mosquito, porém, também contra estes inseticidas têm sido produzidas resistências. De maneira a reduzir a resistência aos agentes químicos é essencial executar medidas de controlo do seu uso. A rotação de vários produtos inseticidas e a utilização moderada destes, devem constituir estratégias a adotar nas regiões endémicas, onde o uso dos agentes químicos é frequente. Para além destas, devem ser implementadas outras medidas que visem à erradicação do vetor, como a destruição dos focos reprodutivos, o uso de biocidas e, especialmente, programas que disponham da participação ativa das populações (Chen *et al.*, 2013; Santacoloma *et al.*, 2012).

8.2 Métodos biológicos

O controlo biológico é um método que recorre ao uso de agentes biocidas com atividade tóxica ou letal contra os vetores. Estes agentes atuam de forma específica nos focos reprodutivos dos insetos, não constituindo qualquer ameaça para outros seres vivos, especialmente os humanos (Marimuthu, Rahuman, & Kirthi, 2013).

O uso de inseticidas químicos induz graves problemas ambientais que resultam em poluição, contaminação dos solos, ocorrência de resistências e perigo para o Homem e outros seres vivos. De modo a contornar estes problemas, têm sido realizadas

experiências utilizando fungos, bactérias e outros biocidas que funcionam como alternativas ao uso de inseticidas sintéticos (Bilal *et al.*, 2012).

Nas experiências realizadas por Bilal *et al.* (2012), os investigadores utilizaram fungos entomopatogênicos da espécie *Metarhizium anisopliae* que mostraram atividade larvívora. Estes fungos possuem seletividade contra o mosquito, não apresentando risco para outras espécies. Para além disto, a sua produção é segura e não poluente e são ecologicamente rentáveis e biodegradáveis.

Como resultado da ineficácia de algumas medidas convencionais e em alternativa a estas, têm sido experimentadas algumas técnicas biológicas inovadoras. A técnica RIDL (*release of insects carrying a dominant lethal*) é uma delas. Esta estratégia utiliza um sistema genético de controlo populacional baseado no desenvolvimento em massa de populações de mosquitos macho geneticamente modificados. Utilizando um gene específico letal e supressor de fêmeas, apenas são produzidos machos estéreis, o que permite controlar as populações de artrópodes. Este método inovador, constitui uma alternativa para as técnicas de repressão tradicionais. Nestas técnicas convencionais são usados machos que possuem a capacidade para localizar de forma específica fêmeas marcadas geneticamente, não se gerando qualquer efeito sobre outros insetos que não estejam marcados. Por conseguinte, a deposição de ovos pelas fêmeas é substancialmente diminuída, resultando numa redução das gerações subsequentes (Jansen & Beebe, 2010; Simmons *et al.*, 2012).

Outra estratégia igualmente inovadora foi a descoberta de que estirpes da bactéria endossimbótica *Wolbachia*, habitualmente presente em artrópodes, podem inibir a replicação do DENV no mosquito *Aedes aegypti*. Em regiões endémicas, a inclusão destas estirpes bacterianas poderia ser utilizada de modo a reduzir, ou mesmo acabar com a propagação do vírus (Jansen & Beebe, 2010). Como os mosquitos infetados pela *Wolbachia* apresentam resistência parcial à infeção viral e possuem capacidade para invadir as populações de mosquitos normais, a utilização desta estratégia biológica pode ser bastante útil na erradicação dos vetores (Simmons *et al.*, 2012).

No Vietname, foram utilizados crustáceos copépodes cuja função é alimentar-se das larvas dos mosquitos *Aedes aegypti*. Apesar de mostrar resultados favoráveis, este método necessita de instalações apropriadas, competência na produção em massa dos copépodes e uma forte atuação populacional, que vise à manutenção e introdução constante destes crustáceos nos reservatórios de água. Assim, torna-se limitativa a sua atuação em larga escala (Guzman *et al.*, 2010; Jansen & Beebe, 2010).

O agente biocida *Bacillus thuringiensis* tem sido utilizado para a produção de nanopartículas de Cobalto com atividade larvicida. Estas partículas são ecológicas, baratas e constituem uma medida de controlo do mosquito *Ae. aegypti* que pode surtir bons efeitos (Marimuthu *et al.*, 2013).

Para uma maior eficácia deste tipo de medidas biológicas inovadoras e promissoras, estas devem ser implementadas em complementaridade com outras estratégias (Jansen & Beebe, 2010).

8.3 Tratamento

A infeção pelo vírus do dengue apresenta um quadro clínico inespecífico e com uma vasta variedade de manifestações clínicas, deste modo, na falta de medicamentos antivíricos eficazes, o tratamento consiste basicamente no suporte e atuação sintomática (World Health Organization, 2009). Aos primeiros sinais da doença devem ser implementadas medidas profiláticas que limitem a virémia (Nguyen *et al.*, 2013).

Em pacientes que não apresentem sintomas de choque, deve ser iniciada, assim que possível, a reposição de fluidos através de soluções de hidratação orais (Gibbons & Vaughn, 2002). Estes indivíduos devem hidratar-se em casa, recorrendo aos serviços de saúde sempre que haja alguma alteração no seu estado que sugira gravidade, por exemplo, hemorragias ou comprometimento vascular. Deste modo, a monitorização dos parâmetros hematológicos diários nestes pacientes é essencial. Nos casos que revelem um insuficiente aporte dos fluidos orais ou que indiquem um acréscimo acentuado no hematócrito, os pacientes devem ser imediatamente hospitalizados para injeção parenteral de soluções de hidratação. Geralmente, nos casos menos graves, administram-se soluções cristalóides. Em caso de hospitalização, os procedimentos invasivos devem ser evitados, sempre que possível, dado que aumentam o risco de hemorragia nos pacientes mais debilitados. Assim, é imperativa a realização de uma avaliação cuidada do doente, implementando soluções viáveis. Entre os indivíduos hospitalizados, é importante vigiar todas as alterações registadas, de modo a evitar a sobredosagem das soluções de hidratação e efeitos iatrogénicos das terapêuticas implementadas (Gibbons & Vaughn, 2002; Simmons *et al.*, 2012).

Nos casos em que os pacientes possuem um quadro clínico de síndrome do choque do dengue é fundamental a restituição do volume intravascular, através da inserção de fluidos por via intravenosa. Nestes indivíduos, quando o quadro clínico se mantém inalterado, não apresentando melhorias após a utilização da terapia cristalóide,

dão-se soluções isotónicas com o intuito de restaurar o volume plasmático. Nos casos moderados de dengue, o lactato de Ringer constitui uma solução de hidratação eficaz, enquanto que nos casos mais graves se recorre a soluções à base de amido ou dextrano (Bäck & Lundkvist, 2013; Simmons *et al.*, 2012).

Quando os pacientes apresentam sinais de hemorragia grave que comprometa a capacidade dos órgãos, a transfusão de sangue, a hemodiálise ou a terapia adjuvante à base de vasopressores, são hipóteses a considerar. Por vezes, podem mesmo ser usadas transfusões profiláticas nos países em que o DENV é endémico, contudo, este método ainda não está standardizado (Simmons *et al.*, 2012).

Sempre que possível, deve evitar-se o uso de Paracetamol, anti inflamatórios não esteróides e salicilatos, devido ao seu efeito negativo no extravasamento plasmático e contribuição para o risco de hemorragias. Para além disto, o ácido acetilsalicílico pode aumentar a probabilidade de desenvolvimento de síndrome de Reye, muito grave em crianças (Bäck & Lundkvist, 2013; Gibbons & Vaughn, 2002).

Como não existe na atualidade nenhum agente terapêutico com eficácia comprovada contra o vírus, recentemente têm sido realizados estudos para o desenvolvimento de novas terapias anti-víricas. Existem experiências com a utilização de corticosteróides como a prednisolona oral em crianças e adultos jovens no Vietname. Também se encontra em investigação o papel da cloroquina e das estatinas na inibição viral. Para além destas potenciais terapêuticas antivirais, têm sido realizados estudos de determinação da eficácia e segurança do inibidor da polimerase do DENV, balapiravir (Simmons *et al.*, 2012).

A investigação de novas terapêuticas antivirais, em concomitância com o desenvolvimento de vacinas e medidas de controlo do vetor, constituem a abordagem mais efetiva na redução da morbilidade associada à doença e prevenção da transmissão do vírus. O sucesso destes tratamentos na infeção pelo DENV depende de certos fatores, tais como a distribuição dos fármacos, a formação dos metabolitos ativos e a ligação às proteínas plasmáticas. Os agentes deverão atuar o mais rapidamente possível, manifestando eficácia contra o mecanismo de replicação viral (Nguyen *et al.*, 2013).

8.3.1 Potencial uso terapêutico do balapiravir

Os análogos dos nucleósidos têm vindo a demonstrar grande sucesso como agentes para o tratamento das infeções virais. Estes análogos atuam como substratos competitivos da polimerase viral, inibindo a síntese de RNA viral (Klump *et al.*, 2006).

O balapiravir é um pró fármaco resultante de um análogo nucleósido designado por R1479 (4'-azidocitina). Esta molécula, com atividade antiviral, foi desenvolvida por Hoffmann-La Roche com o intuito de ser utilizada contra o vírus da hepatite C (HCV), tendo apresentado capacidade inibidora específica da replicação do RNA viral (Nguyen *et al.*, 2013). O balapiravir mostrou ser uma promessa na terapêutica antiviral, revelando baixa toxicidade, elevada estabilidade e uma margem terapêutica aceitável *in vitro* (Klump *et al.*, 2006).

Como tanto a polimerase do HCV quanto a do DENV são dependentes de RNA e apresentam uma estrutura semelhante, foram realizados estudos de modo a testar a atividade do análogo R1479 contra o vírus do dengue, explorando assim novas aplicações do balapiravir. Os investigadores realizaram experiências com o propósito de determinar a eficácia, tolerância e segurança do pró fármaco balapiravir em pacientes adultos infetados pelo DENV. Os pacientes examinados receberam doses de 1500 mg e 3000 mg de balapiravir duas vezes por dia durante cinco dias. Apesar da molécula R1479 ter expressado capacidade para diminuir a replicação do vírus em células humanas *in vitro* e ter sido segura e bem tolerada nos pacientes analisados, contudo, não manifestou uma melhoria nos aspetos clínicos da infeção. A análise dos resultados sugere, assim, a necessidade de realização de novos estudos que investiguem com mais detalhe a aplicação do balapiravir como potencial agente contra o vírus do dengue (Nguyen *et al.*, 2013).

8.3.2 Novas estratégias terapêuticas de uso antiviral

Apesar do forte avanço na descoberta de novas moléculas com potencial contra o vírus do dengue, muitos destes agentes não passaram dos estágios de desenvolvimento iniciais. O agente antiviral ideal deve contemplar características que, por vezes, representam um autêntico desafio. Estas moléculas devem possuir os seguintes aspetos, serem seguras e bem toleradas, especialmente em crianças, devem reduzir os sintomas de forma rápida e eficaz, devem atuar contra os quatro serótipos e serem, de preferência, administradas oralmente (Lim *et al.*, 2013).

A entrada do vírus nas células hospedeiras via recetores moleculares, é o passo essencial para a replicação viral e, consequentemente, para a disseminação da infeção. Como foi referido em capítulos anteriores, a proteína do invólucro possui um papel crucial na fusão do DENV com os recetores celulares. Deste modo, uma melhor compreensão deste mecanismo e de todas as moléculas envolvidas contribuirá para o

desenvolvimento de novos agentes com propriedades antivirais. Os estudos recentes relativos a partículas do hospedeiro envolvidas na endocitose viral são uma abordagem interessante, que pode solucionar as várias dificuldades no desenvolvimento de uma cura para o dengue. Estudando as estruturas, propriedades e interações dos hidratos de carbono envolvidos, pode-se descobrir potenciais agentes inibidores da entrada do DENV na célula hospedeira. Algumas moléculas derivadas de hidratos de carbono manifestaram um carácter inibidor da entrada do vírus, particularmente glicosaminoglicanos (GAG), glicoproteínas, glicosfingolípido e lectinas. Estas partículas atuam nos principais processos da endocitose viral, ou seja, na absorção e na fusão do DENV (Hidari, Abe, & Suzuki, 2013). A figura 11 representa esquematicamente a entrada do vírus na célula e as moléculas envolvidas na inibição deste processo.

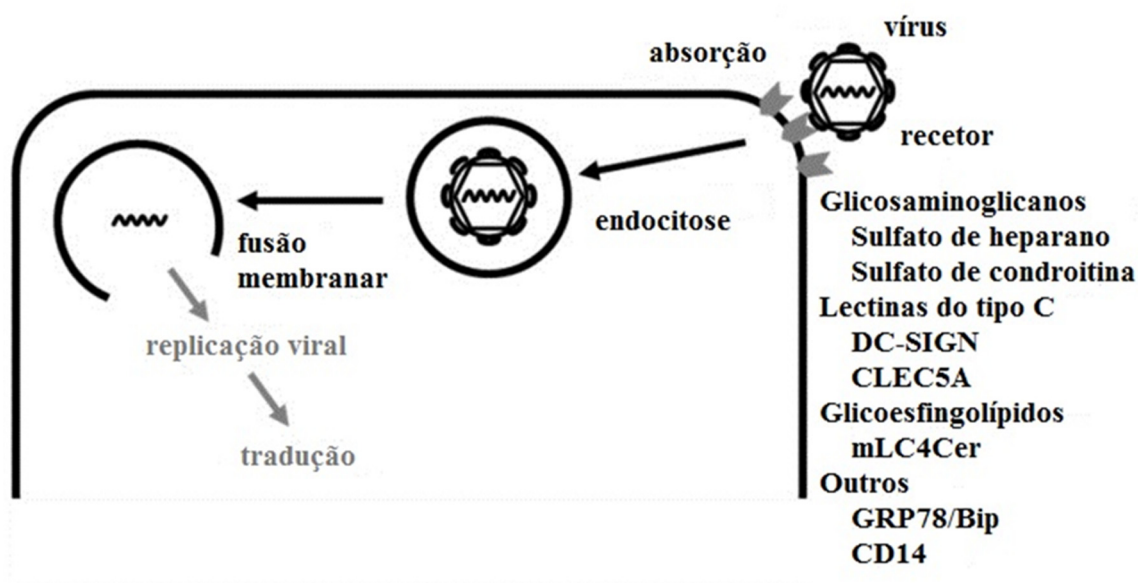


Figura 11. Via de entrada do vírus na célula hospedeira, com representação dos receptores celulares envolvidos. Estes receptores poderão ser os alvos no desenvolvimento de agentes antivirais. (Adaptado de: Hidari *et al.*, 2013).

Os inibidores da absorção viral, possuem um elevado potencial no desenvolvimento de agentes anti-DENV, podendo ser usados concomitantemente com outros agentes terapêuticos. Para além da inibição da entrada do vírus na célula hospedeira, pode explorar-se também o mecanismo de fusão como alvo possível para os agentes antivirais (Hidari *et al.*, 2013).

Atualmente, têm sido pesquisadas novas abordagens para o desenvolvimento de terapêuticas antivirais. Estas estratégias baseiam-se em dois aspectos principais, na

inibição de alvos do vírus e na inibição de alvos do hospedeiro. Os alvos da inibição viral incluem, a entrada do vírus na célula focando-se na porção na glicoproteína do invólucro, a glicoproteína da cápside, as glicoproteínas não estruturais, a protease, a helicase, a metiltransferase, as polimerases, a tradução viral e a glucosidade celular. Por outro lado, a síntese da pirimidina, a síntese de colesterol e a glucosidase celular, constituem os alvos de inibição no hospedeiro (Lim *et al.*, 2013).

Um composto inibidor da alfa glucosidase celular, o celgosivir, encontra-se em avaliação clínica, porém, a sua potência ainda é desconhecida (Lim *et al.*, 2013).

8.4 Vacinas

Em 1945, foi composta a primeira vacina com potencial contra o vírus do dengue. Para a produção desta vacina, os investigadores Sabin e Schlesinger utilizaram as estirpes atenuadas do serótipo DENV-1, de origem havaiana, inoculadas a partir de cérebros de ratos infectados pelo vírus. Desde então, têm sido alcançados vários progressos na produção de vacinas (Edelman, 2007).

O aparecimento de mutações no RNA do virião constitui um mecanismo de evolução que lhe permite evitar a resposta imune fazendo com que o vírus do dengue se torne mais flexível, resistente e adaptado ao meio circundante. Posto isto, o desenvolvimento de estratégias antivirais e de vacinas é dificultado, não havendo até à data nenhuma vacina disponível contra o DENV (Faheem *et al.*, 2011). Uma melhor compreensão da patogénese viral e dos mecanismos associados à evasão do vírus ao sistema imunitário inato e adaptativo, pode conduzir ao desenvolvimento de potenciais compostos antivirais (Yossef *et al.*, 2012).

A produção de uma vacina contra o dengue tem apresentado diversas dificuldades, em parte devido há existência de quatro subtipos do vírus, cada um dos quais com genótipos e glicoproteínas virais ligeiramente diferentes. A doença hemorrágica fatal deriva de uma infeção secundária por um serótipo diferente daquele que causou a infeção passada. Os anticorpos e a imunidade adquirida, a partir da primeira infeção, aparecem subsequentemente, promovendo a infeção pelo segundo subtipo, em vez de fornecer uma imunidade total para todos os serótipos do vírus. Posto isto, verifica-se que uma vacina efetiva terá que estimular anticorpos contra os quatro tipos de uma só vez, o que representa um desafio (Goodsell, 2008).

Um dos motivos para o pouco progresso alcançado até à data, deve-se à dificuldade em encontrar um hospedeiro viável para a experimentação *in vitro* e *in vivo*

dos preparados virais. Mesmo os primatas geneticamente semelhantes aos humanos, após inoculação pelo DENV, não apresentam manifestações da doença, desenvolvendo apenas uma virémia moderada. Deste modo, a análise das potenciais vacinas é dificultada (Rico-Hesse, 2007).

Existem muitos estudos direcionados para o domínio III da glicoproteína viral E, nomeadamente no estabelecimento de epítomos neutralizantes contra este domínio. O propósito disto é criar uma vacina efetiva e produzir anticorpos monoclonais com potencial terapêutico. Foi desenvolvido um anticorpo monoclonal designado de 4E11, com atividade neutralizante e com capacidade de ligação ao domínio III do DENV-1. De modo a determinar a atividade neutralizante, têm vindo a ser estudados os epítomos dos anticorpos contra os quatro serótipos do vírus do dengue. A identificação destes epítomos nos quatro serótipos proporcionará o desenvolvimento de estratégias de avaliação da efetividade de potenciais vacinas tetravalentes (Clyde *et al.*, 2006).

A vacina ideal terá de contemplar vários aspectos, isto é, terá que conferir imunidade permanente contra os quatro serótipos do vírus, não apresentar reatividade, não ser tóxica e ser economicamente acessível (Guzman *et al.*, 2010).

Existem vários laboratórios envolvidos na criação de vacinas seguras e eficazes contra o vírus do dengue, incluindo vacinas proteicas, vacinas vivas atenuadas, vacinas inativadas, vacinas de DNA recombinante e ainda vacinas constituídas por partículas virais. De modo a contornar o fenómeno ADE, pretende-se desenvolver vacinas tetravalentes que possuam como propósito proteger contra todos os serótipos simultaneamente, de modo a evitar e contornar a formação de complexos reativos. Assim com as vacinas vivas atenuadas, as vacinas de DNA recombinante e as vacinas de partículas virais estimulam os dois tipos de imunidade, humoral e celular, a imunidade permanente está ligada a este tipo de vacinas (Faheem *et al.*, 2011).

8.4.1 Vacinas vivas atenuadas

As vacinas vivas atenuadas são um tipo de vacina bastante vantajoso, pois não requerem inoculações múltiplas, são mais económicas e induzem a resposta do complexo de histocompatibilidade major de tipo I (Edelman, 2007).

Nos últimos anos têm sido alcançados fortes progressos neste âmbito. As vacinas vivas atenuadas são as mais adiantadas no desenvolvimento e avaliação clínica, na medida em que têm vindo a ser desenvolvidos ensaios clínicos de fase II e III com o

intuito de avaliar a eficácia das formulações produzidas (Durbin & Whitehead, 2010; Simmons *et al.*, 2012).

Encabeçando a lista das vacinas candidatas, encontra-se a *ChimeriVax*, desenvolvida pelos laboratórios *Sanofi Pasteur/Acambis*. Esta vacina tetravalente é composta por estirpes atenuadas da vacina da febre amarela 17D (YF-VAX), que expõem as glicoproteínas virais prM e E. Na elaboração da vacina, substituíram-se os genes codificantes das proteínas prM e E, da YF-VAX, por proteínas do invólucro de outros flavivírus, inclusive do próprio vírus do dengue. A *ChimeriVax* apresentou resultados favoráveis relativamente à tolerância, reatividade, seroconversão e imunogenicidade (Edelman, 2007; Simmons *et al.*, 2012).

Outra vacina candidata, foi desenvolvida pelo *Walter Reed Army Institute of Research* (WRAIR) em parceria com a *GlaxoSmithKline* (GSK). Esta vacina viva tetravalente é composta por estirpes dos quatro serótipos de DENV, que foram atenuados através de cultura em passagem de células de rim de cão (Thomas *et al.*, 2013). Em resultado de ensaios clínicos de fase I e II, realizados em adultos e posteriormente em crianças, esta formulação demonstrou ser segura, bem tolerada e apresentou propriedades imunogénicas contra os quatro serótipos do DENV (Sun *et al.*, 2009). Para além desta formulação, a parceria WRAIR-GSK desenvolveu uma nova candidata, derivada da anterior. Esta formulação foi preparada através do mesmo processo de produção, contudo, utilizando uma cultura celular e um estabilizante diferentes. Os ensaios de fase II, realizados em adultos, revelaram um perfil satisfatório, com segurança e imunogenicidade favoráveis, porém, devem ser efetuados mais estudos a larga escala, de modo a avaliar a capacidade desta vacina (Thomas *et al.*, 2013).

De modo a desenvolver uma vacina viva utilizando um método de atenuação diferente, o *Laboratory of Infectious Diseases* utilizou um clone de DNA complementar do DENV-4, contendo uma deleção na região não codificante 3'. Esta deleção, designada de $\Delta 30$, constitui uma evolução genética, contribuindo para a criação de vírus com propriedades quiméricas e possuindo os genes das proteínas E e prM dos outros serótipos. Após avaliação clínica desta candidata monovalente, em voluntários adultos, o vírus contendo a mutação (rDEN4 $\Delta 30$), apresentou um perfil estável, seguro, bem tolerado e muito imunogénico (Durbin & Whitehead, 2010; Edelman, 2007).

Capítulo 9 – Conclusão

A presente dissertação, constitui uma revisão bibliográfica que compila informação atualizada, permitindo uma maior compreensão acerca do vírus do dengue, suas causas e consequências a nível global.

Ao longo dos últimos anos, a doença causada pelo DENV tem vindo a registar um acréscimo dramático, tendo-se tornado uma preocupação para a saúde pública mundial e acarretando elevadas perdas sociais e económicas. Além de pouco progresso no desenvolvimento de vacinas e agentes antivirais, o surgimento de resistência a inseticidas em populações de mosquitos, a falta geral de apoio aos programas de controlo do vetor e o aumento global no tráfego aéreo, contribuem para o acréscimo na frequência e prevalência das arboviroses, e em especial, do dengue.

Os progressos alcançados na caracterização do DENV, contribuíram para uma melhor compreensão da sua estrutura, ciclo de replicação e patogénese, o que constitui uma grande vantagem. Todavia, muito ainda se desconhece no que diz respeito à interação dos fatores virais e do hospedeiro, que levam ao desenvolvimento da infeção. Como o DENV possui uma maquinaria genética que lhe permite evadir do sistema imunitário, uma melhor investigação nesta área contribuiria para a criação de agentes com potencial antiviral, atuando neste mecanismo defensivo do vírus.

O padrão de transmissão do DENV depende da interação de vários parâmetros, incluindo a dinâmica de multiplicação do vírus, a ecologia, o comportamento dos vetores e a resposta imunitária dos hospedeiros humanos. Os artrópodes transmissores da infeção possuem como habitat preferencial, regiões tropicais e subtropicais, com um clima favorável à sua reprodução, porém, encontram-se disseminados um pouco por todo o globo. As zonas aquíferas, águas estagnadas e pneus, contituem os focos reprodutivos mais comuns destas espécies. Como estes fatores podem criar condições favoráveis para a distribuição e sobrevivência do mosquito, o risco de arboviroses é eminente. As epidemias ocorrem geralmente em estações quentes, húmidas e chuvosas, propícias à proliferação do vetor.

Apesar da implementação de inúmeras medidas de controlo, químicas e biológicas, a erradicação dos mosquitos permanece um desafio difícil de alcançar, principalmente em países subdesenvolvidos. Nestas áreas, as estratégias nem sempre conseguem ser postas em prática, tal devendo-se aos escassos recursos humanos e financeiros, ou à sobrepopulação destas regiões, o que torna difícil passar a mensagem.

Assim sendo, devem aplicar-se medidas interventivas que visem a cooperação das populações, permitindo o controlo dos vetores e erradicação dos seus focos reprodutivos.

A crescente globalização, consequente do elevado número de viajantes, faz com que aumente a propagação do vírus do dengue para países outrora não afetados, tornando-se endémicos.

Nos países onde o vírus não é endémico, é essencial uma boa compreensão das características clínicas da doença, com o objetivo de realizar um diagnóstico preciso. Em áreas urbanas, a avaliação clínica aliada à utilização de *kits* rápidos de diagnóstico permite uma atuação mais célere, o que contribui para a minimização das consequências associadas à infeção. No entanto, em regiões rurais onde tal nem sempre é possível, e não existindo laboratórios disponíveis, a identificação dos casos por parte de pessoal experiente e qualificado é essencial.

Um entendimento das manifestações clínicas da infeção, aliado a um diagnóstico comprovativo são parâmetros que contribuem para a gestão da doença e rápida atuação. A abordagem terapêutica utilizada correntemente é a terapia de suporte e monitorização dos fluidos corporais. Se implementada durante a fase inicial da infeção, esta terapêutica de suporte, permite a redução dos níveis virais podendo prevenir ou atenuar o desenvolvimento dos síndromes mais severos como a febre hemorrágica e o síndrome de choque.

A pesquisa de novas estratégias antivirais, em concomitância com a implementação de medidas de controlo do vetor, constituem a abordagem mais efetiva na prevenção da transmissão do vírus e redução da morbilidade e mortalidade associadas à infeção. O sucesso destas terapêuticas depende de certos fatores, tais como a distribuição dos fármacos, a formação dos metabolitos ativos e a ligação às proteínas plasmáticas. Os agentes deverão atuar o mais rapidamente possível, ser seguros, bem tolerados e manifestar eficácia contra os quatro serótipos do DENV .

Em suma, o esforço contínuo dos últimos anos vai conduzir à descoberta de uma cura num futuro próximo. Contudo, até que seja obtido o desenvolvimento definitivo de uma vacina eficaz contra o vírus do dengue, a prevenção deve focar-se na implementação de estratégias que contribuam para a redução do impacto da infeção para a saúde.

Bibliografia

- Adalja, A. a, Sell, T. K., Bouri, N., e Franco, C. (2012). Lessons learned during dengue outbreaks in the United States, 2001-2011. *Emerging infectious diseases*, 18(4), 608–14. doi:10.3201/eid1804.110968.
- Allison, S. L., Schlich, J., Stiasny, K., Mandl, C. W., e Heinz, F. X. (2001). Mutational Evidence for an Internal Fusion Peptide in Flavivirus Envelope Protein E. *Journal of Virology*, 75(9), 4268–4275. doi:10.1128/JVI.75.9.4268.
- Almeida, A., Galão, R., Sousa, C., Novo, M., Parreira, R., Pinto, J., ... Esteves, A. (2008). Potential mosquito vectors of arboviruses in Portugal: species, distribution, abundance and West Nile infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 10 (8), 823–32. doi:10.1016/j.trstmh.2008.03.011.
- Almeida, A. P., Gonçalves, Y. M., Sousa, C. A., Melim, M., e Gracio, A. J. (2007). Vector monitoring of *Aedes aegypti* in the Autonomous Region of Madeira, Portugal. *Euro Surveillance Weekly Release*, 12(46), 3311. Disponível em <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3311>.
- Alvarez, D. E., Lodeiro, M. F., Ludueña, S. J., Lía, I., Gamarnik, A. V, Lodeiro, F., e Luduen, S. J. (2005). Long-Range RNA-RNA Interactions Circularize the Dengue Virus Genome Long-Range RNA-RNA Interactions Circularize the Dengue Virus Genome. *Journal of Virology*, 79(11), 6631–6643. doi:10.1128/JVI.79.11.6631.
- Alves, M. J., Fernandes, P. L., Amaro, F., Osório, H., Luz, T., Parreira, P., ... Zeller, H. (2013). Clinical presentation and laboratory findings for the first autochthonous cases of dengue fever in Madeira island, Portugal, October 2012. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 18(6), 3–6. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23410256>.
- Andries, A.-C., Duong, V., Ngan, C., Ong, S., Huy, R., Sroin, K. K., ... Buchy, P. (2012). Field evaluation and impact on clinical management of a rapid diagnostic kit that detects dengue NS1, IgM and IgG. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(12), 1–9. doi:10.1371/journal.pntd.0001993.

- Añez, G., e Rios, M. (2013). Dengue in the United States of America: a worsening scenario? *BioMed Research International*, 2013, 1–13. doi:10.1155/2013/678645.
- Bäck, A. T., e Lundkvist, A. (2013). Dengue viruses - an overview. *Infection ecology & epidemiology*, 3, 1–21. doi:10.3402/iee.v3i0.19839.
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., ... Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504–7. doi:10.1038/nature12060.
- Bilal, H., Hassan, S. A., e Khan, I. A. (2012). Isolation and efficacy of entomopathogenic fungus (*Metarhizium anisopliae*) for the control of *Aedes albopictus* Skuse larvae: suspected dengue vector in Pakistan. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2(4), 298–300. doi:10.1016/S2221-1691(12)60026-4.
- Carvalho, I. L., Rocha, D. K., e Almeida, a P. G. (2011). Immune reactivity to dengue and *Aedes albopictus* mosquitoes in the population from Macao, China, before dengue occurrence. *In vivo (Athens, Greece)*, 25(4), 625–31. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21709006>.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2013). Yellow Fever. Consultado a 5 de Agosto de 2013, disponível em <http://wwwnc.cdc.gov/travel/diseases/yellow-fever>.
- Chen, C. D., Nazni, W. a, Lee, H. L., Norma-Rashid, Y., Lardizabal, M. L., e Sofian-Azirun, M. (2013). Temephos resistance in field *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) from Selangor, Malaysia. *Tropical biomedicine*, 30(2), 220–30. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23959487>.
- Clemons, A., Haugen, M., Flannery, E., Tomchaney, M., Jacowski, C., Le, C., ... Duman-scheel, M. (2010). *Aedes aegypti*: an Emerging Model for Vector Mosquito Development. *National Institute of Health*, (574).
- Clyde, K., Kyle, J. L., e Harris, E. (2006). Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *Journal of virology*, 80(23), 11418–31. doi:10.1128/JVI.01257-06.

- Coffey, L. L., Mertens, E., Brehin, A.-C., Fernandez-Garcia, M. D., Amara, A., Després, P., e Sakuntabhai, A. (2009). Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. *Microbes and Infection*, 11(2), 143–156. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2008.12.006.
- Delatte, H., Paupy, C., Dehecq, J. S., Thiria, J., Failloux, A. B., e Fontenille, D. (2008). *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue viruses in Reunion Island: biology and control. *Parasite*, 11(1), 3–13.
- Dieng, H., Saifur, R. G., Ahmad, A. H., Salmah, M. C., Aziz, A. T., Satho, T., ... Morales, R. E. (2012). Unusual developing sites of dengue vectors and potential epidemiological implications. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2(3), 228–32. doi:10.1016/S2221-1691(12)60047-1.
- Domanovic, D., Jain, R., Payne, L., Mantero, J., Marrama, L., Robesyn, E., ... Falcão, I. M. (2012). *Autochthonous dengue cases in Madeira, Portugal* (pp. 2–8). Stockholm.
- Durbin, A. P., e Whitehead, S. S. (2010). Dengue Virus. In A. L. Rothman (Ed.), *Dengue Virus* (Vol. 338, pp. 129–143). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-02215-9.
- Edelman, R. (2007). Dengue vaccines approach the finish line. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 45(1), S56–60. doi:10.1086/518148.
- Faheem, M., Raheel, U., Riaz, M., Kanwal, N., Javed, F., Zaidi, N., e Qadri, I. (2011). A molecular evaluation of dengue virus pathogenesis and its latest vaccine strategies. *Molecular Biology Reports*, 38(6), 3731–3740. doi:10.1007/s11033-010-0488-1.
- Filomatori, C. V, Iglesias, N. G., Villordo, S. M., Alvarez, D. E., e Gamarnik, A. V. (2011). RNA sequences and structures required for the recruitment and activity of the dengue virus polymerase. *The Journal of biological chemistry*, 286(9), 6929–39. doi:10.1074/jbc.M110.162289.

- Franco, L., Palacios, G., Martinez, J. A., Vázquez, A., Savji, N., De Ory, F., ... Tenorio, A. (2011). First report of sylvatic DENV-2-associated dengue hemorrhagic fever in West Africa. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(8), e1251. doi:10.1371/journal.pntd.0001251.
- Frank, C., Höhle, M., Stark, K., e Lawrence, J. (2013). More reasons to dread rain on vacation? Dengue fever in 42 German and United Kingdom Madeira tourists during autumn 2012. *Euro surveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 18(14), 14–17. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23594519>.
- Gibbons, R. V, e Vaughn, D. W. (2002). Dengue: an escalating problem. *BMJ*, 324(7353), 1563–1566.
- Goodsell, D. (2008). Molecule of the month: Dengue virus. *RCSB Protein Data Bank*. Consultado a 16 de Abril de 2013, disponível em <http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=103>.
- Gratz, N. G. (2004). Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Medical and veterinary entomology*, 18(3), 215–27. doi:10.1111/j.0269-283X.2004.00513.x.
- Gubler, D J. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical microbiology reviews*, 11(3), 480–96. Disponível em <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=88892&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Gubler, Duane J. (2002). Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends in Microbiology*, 10(2), 100–103. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02288-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02288-0).
- Guzman, A., e Istúriz, R. (2010). Update on the global spread of dengue. *International journal of antimicrobial agents*, 36(1), S40–2. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.06.018.

- Guzman, M. G., Alvarez, M., Rodriguez-Roche, R., Bernardo, L., Montes, T., Vazquez, S., ... Halstead, S. B. (2007). Neutralizing antibodies after infection with dengue 1 virus. *Emerging infectious diseases*, 13(2), 282–6. doi:10.3201/eid1302.060539.
- Guzman, M., Halstead, S., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D., ... Peeling, R. (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nature reviews. Microbiology*, 8(12), S7–16. doi:10.1038/nrmicro2460.
- Halstead, S. (2008). Dengue virus-mosquito interactions. *Annual Review of Entomology*, 53, 273–291.
- Halstead, S. B. (2008). Dengue: Overview and History. In S. Halstead, Scott ; Pasvol, Geoffrey; Hoffman (Ed.), *Dengue, Tropical Medicine: Science and Practice - Vol. 5* (1st ed., pp. 1–9). London: Imperial College Press. doi:10.1007/SpringerReference_86057.
- Henchal, E. A., e Putnak, J. R. (1990). The dengue viruses. *Clinical microbiology reviews*, 3(4), 376–96. Disponível em <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=358169&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hidari, K. I. P. J., Abe, T., e Suzuki, T. (2013). Crabohydrate-related inhibitors of dengue virus entry. *Viruses*, 5(2), 605–18. doi:10.3390/v5020605.
- Hopp, M. J., e Foley, J. A. (2001). Global-scale relationships between climate and the dengue dever vector, *Aedes aegypti*. *Climatic Change*, 48(2-3), 441–463. doi:10.1023/A:1010717502442.
- Hunsperger, E. a, Yoksan, S., Buchy, P., Nguyen, V. C., Sekaran, S. D., Enria, D. a, ... Peeling, R. W. (2009). Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. *Emerging infectious diseases*, 15(3), 436–40. doi:10.3201/eid1503.080923.
- Iglesias, N. G., Filomatori, C. V, e Gamarnik, A. V. (2011). The F1 motif of dengue virus polymerase NS5 is involved in promoter-dependent RNA synthesis. *Journal of virology*, 85(12), 5745–56. doi:10.1128/JVI.02343-10.

- Iglesias, N. G., e Gamarnik, A. V. (2011). Dynamic RNA structures in the dengue virus genome. *RNA Biology*, 8(2), 249–257. doi:10.4161/rna.8.2.14992.
- Jansen, C. C., e Beebe, N. W. (2010). The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 12(4), 272–9. doi:10.1016/j.micinf.2009.12.011.
- Jessie, K., Fong, M. Y., Devi, S., Lam, S. K., e Wong, K. T. (2004). Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *The Journal of infectious diseases*, 189(8), 1411–8. doi:10.1086/383043.
- Kalayanarooj, S., Gibbons, R. V, Vaughn, D., Green, S., Nisalak, A., Jarman, R. G., ... Perng, G.-C. (2007). Blood group AB is associated with increased risk for severe dengue disease in secondary infections. *The Journal of infectious diseases*, 195(7), 1014–7. doi:10.1086/512244.
- Klumpp, K., Lévêque, V., Le Pogam, S., Ma, H., Jiang, W.-R., Kang, H., ... Nájera, I. (2006). The novel nucleoside analog R1479 (4'-azidocytidine) is a potent inhibitor of NS5B-dependent RNA synthesis and hepatitis C virus replication in cell culture. *The Journal of biological chemistry*, 281(7), 3793–9. doi:10.1074/jbc.M510195200.
- Lambrechts, L., Scott, T. W., e Gubler, D. J. (2010). Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(5), e646. doi:10.1371/journal.pntd.0000646.
- Lim, S. P., Wang, Q.-Y., Noble, C. G., Chen, Y.-L., Dong, H., Zou, B., ... Shi, P.-Y. (2013). Ten years of dengue drug discovery: progress and prospects. *Antiviral research*, 1–79. doi:10.1016/j.antiviral.2013.09.013.
- Lima-Camara, T. N., Bruno, R. V, Luz, P. M., Castro, M. G., Lourenço-de-Oliveira, R., Sorgine, M. H. F., e Peixoto, A. a. (2011). Dengue infection increases the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. *PloS one*, 6(3), e17690. doi:10.1371/journal.pone.0017690.

- Luz, P. M., Lima-Camara, T. N., Bruno, R. V., Castro, M. G. De, Sorgine, M. H. F., Lourenço-de-Oliveira, R., e Peixoto, A. A. (2011). Potential impact of a presumed increase in the biting activity of dengue-virus-infected *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females on virus transmission dynamics. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(6), 755–8.
- Marimuthu, S., Rahuman, A. A., e Kirthi, A. V. (2013). Eco-friendly microbial route to synthesize cobalt nanoparticles using *Bacillus thuringiensis* against malaria and dengue vectors. *Parasitology Research*. doi:10.1007/s00436-013-3601-2.
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., e Harrison, S. C. (2004). Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, 427(6972), 313–9. doi:10.1038/nature02165.
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., e Harrison, S. C. (2012). Crystal structure of the dengue 2 virus envelope glycoprotein in the postfusion conformation. *RCSB Protein Data Bank*. Consultado a 16 de Abril de 2013, disponível em <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1ok8>.
- Mohamed, M. S., Hany, a K., e Emad, I. K. (2013). Life table characteristics of *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) from Saudi Arabia. *Tropical biomedicine*, 30(2), 301–14. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23959496>.
- Moi, M. L., Lim, C.-K., Chua, K. B., Takasaki, T., e Kurane, I. (2012). Dengue virus infection-enhancing activity in serum samples with neutralizing activity as determined by using FcγR-expressing cells. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(2), e1536. doi:10.1371/journal.pntd.0001536.
- Nguyen, N. M., Tran, C. N. B., Phung, L. K., Duong, K. T. H., Huynh, H. L. A., Farrar, J., ... Simmons, C. P. (2013). A randomized, double-blind placebo controlled trial of balapiravir, a polymerase inhibitor, in adult dengue patients. *The Journal of infectious diseases*, 207(9), 1442–50. doi:10.1093/infdis/jis470.
- Peeling, R. W., Artsob, H., Pelegriño, J. L., Buchy, P., Cardoso, M. J., Devi, S., ... Yoksan, S. (2010). Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nature Reviews Microbiology*, 8(12), S30–S37. doi:10.1038/nrmicro2459.

- Platt, K. B., Linthicum, K. J., Myint, K. S., Innis, B. L., Lerdthusnee, K., e Vaughn, D. W. (1997). Impact of dengue virus infection on feeding behavior of *Aedes aegypti*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 57(2), 119–25. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9288801>.
- Rainwater-Lovett, K., Rodriguez-Barraquer, I., Cummings, D. a T., e Lessler, J. (2012). Variation in dengue virus plaque reduction neutralization testing: systematic review and pooled analysis. *BMC infectious diseases*, 12(1), 233. doi:10.1186/1471-2334-12-233.
- Rico-Hesse, R. (2007). Dengue virus evolution and virulence models. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 44(11), 1462–6. doi:10.1086/517587.
- Roberto, M., Nunes, T., Faria, N. R., Vasconcelos, H. B., Barbosa, D., Medeiros, D. A., ... Fernando, P. (2012). Phylogeography of Dengue Virus Serotype 4, Brazil, 2010-2011, 18(11), 2010–2011.
- Santacoloma, L., Chaves, B., e Brochero, H. L. (2012). Estado de la susceptibilidad de poblaciones naturales del vector del dengue a insecticidas en trece localidades de Colombia. *Biomedica*, 32(3), 333–343. doi:10.1590/S0120-41572012000300004.
- Simmons, C., Farrar, J., Van Vinh Chau, N., e Wills, B. (2012). Dengue. *New England Journal of Medicine*, 366, 1423–1432. doi:10.1056/NEJMra1110265.
- Sousa, C. a, Clairouin, M., Seixas, G., Viveiros, B., Novo, M. T., Silva, a C., ... Economopoulou, a. (2012). Ongoing outbreak of dengue type 1 in the Autonomous Region of Madeira, Portugal: preliminary report. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 17(49), 8–11. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23231893>.
- Srikiatkachorn, A., Rothman, A. L., Gibbons, R. V, Sittisombut, N., Malasit, P., Ennis, F. a, ... Kalayanaroj, S. (2011). Dengue--how best to classify it. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 53(6), 563–7. doi:10.1093/cid/cir451.

- Standard Diagnostics. (2007). Dengue NS1 Ag + Ab Combo. Consultado a 10 de Outubro de 2013, disponível em http://www.standardia.com/html_e/mn03/mn03_01_00.asp?intId=98.
- Stoddard, S. T., Forshey, B. M., Morrison, A. C., Paz-Soldan, V. a, Vazquez-Prokopec, G. M., Astete, H., ... Scott, T. W. (2013). House-to-house human movement drives dengue virus transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(3), 994–9. doi:10.1073/pnas.1213349110.
- Sun, W., Cunningham, D., Wasserman, S. S., Perry, J., Putnak, J. R., Eckels, K. H., ... Edelman, R. (2009). Phase 2 clinical trial of three formulations of tetravalent live-attenuated dengue vaccine in flavivirus-naïve adults. *Human Vaccines*, 5(1), 33–40. doi:10.4161/hv.5.1.6348.
- Thomas, S. J., Eckels, K. H., Carletti, I., De La Barrera, R., Dessy, F., Fernandez, S., ... Innis, B. L. (2013). A phase II, randomized, safety and immunogenicity study of a re-derived, live-attenuated dengue virus vaccine in healthy adults. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 88(1), 73–88. doi:10.4269/ajtmh.2012.12-0361.
- Tomasello, D., e Schlagenhauf, P. (2013). Chikungunya and dengue autochthonous cases in Europe, 2007-2012. *Travel medicine and infectious disease*, 1477(13). doi:10.1016/j.tmaid.2013.07.006.
- University of Management and Technology. (2013). Dengue Awareness. Consultado a 9 de Agosto de 2013, disponível em <http://umt.edu.pk/ofm/Core-Functions/Healthcare-Service-Unit/Dengue-Awareness.aspx>.
- Wai, K. T., Htun, P. T., Oo, T., Myint, H., Lin, Z., Kroeger, A., ... Petzold, M. (2012). Community-centred eco-bio-social approach to control dengue vectors: an intervention study from Myanmar. *Pathogens and global health*, 106(8), 461–8. doi:10.1179/2047773212Y.0000000057.
- Wang, E., Ni, H., Xu, R., Barrett, A. D. T., Watowich, S. J., Gubler, D. J., e Weaver, S. C. (2000). Evolutionary Relationships of Endemic / Epidemic and Sylvatic Dengue Viruses, 74(7), 3227–3234.

- Wang, S. M., e Sekaran, S. D. (2010). Early diagnosis of Dengue infection using a commercial Dengue Duo rapid test kit for the detection of NS1, IGM, and IGG. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 83(3), 690–5. doi:10.4269/ajtmh.2010.10-0117.
- Weaver, S. C., e Vasilakis, N. (2009). Molecular Evolution of Dengue Viruses: Contributions of Phylogenetics to Understanding the History and Epidemiology of the Preeminent Arboviral Disease. *Infect Genet Evol.*, 9(4), 523–540. doi:10.1016/j.meegid.2009.02.003.Molecular.
- Whitehead, S. S., Blaney, J. E., Durbin, A. P., e Murphy, B. R. (2007). Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature*, 5, 518–528. doi:10.1038/nrmicro1690.
- Wings, H., Regina, T., Silva, R., Souza, K. P., Nali, C., Danielle, V., ... Aquino, V. H. (2008). A Simple One-Step Real-Time RT-PCR for Diagnosis of Dengue Virus Infection. *Journal of Medical Virology*, 80(8), 1426–1433. doi:10.1002/jmv.
- World Health Organization. (2009). *Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control*. (pp. 1–147). Geneva.
- World Health Organization. (2012). Dengue fever in Madeira, Portugal. *Weekly epidemiological record*, 87(43), 413–420. Disponível em <http://www.who.int/wer>.
- Wu, S. J., Grouard-Vogel, G., Sun, W., Mascola, J. R., Brachtel, E., Putvatana, R., ... Frankel, S. S. (2000). Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nature medicine*, 6(7), 816–20. doi:10.1038/77553.
- Yossef, R., Rosental, B., Appel, M. Y., HersHKovitz, O., e Porgador, A. (2012). Upregulation of MHC class I expression following dengue virus infection: the mechanism at the promoter level. *Expert review of anti-infective therapy*, 10(3), 285–7. doi:10.1586/eri.12.7.